

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES
INMUNOSUPRESORAS DE LAS CÉLULAS
MESENQUIMALES Y DE SU IMPACTO SOBRE EL
EFECTO INJERTO CONTRA LEUCEMIA EN
TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES
HEMATOPOYÉTICOS**

Alberto Oviedo Casado
Madrid, 2011

**Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular**



TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES
INMUNOSUPRESORAS DE LAS CÉLULAS
MESENQUIMALES Y DE SU IMPACTO SOBRE EL
EFECTO INJERTO CONTRA LEUCEMIA EN
TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES
HEMATOPOYÉTICOS**

Memoria presentada por **ALBERTO OVIEDO CASADO** para optar al grado de doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Directores de Tesis: **Dra. María Lamana Luzuriaga**
Dra. Rosa María Yáñez González

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en la División de Hematopoyesis y Terapia Génica del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT)/Centro de investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER).

A mi madre

*"Canta, ríe, salta, baila
porque cuando se baje el telón todo habrá terminado.
La vida es una obra de teatro que no permite ensayos...
Por eso, canta, ríe, baila, llora
y vive intensamente cada momento de tu vida...
...antes que el telón baje
y la obra termine sin aplausos."*

Charles Chaplin

I

I. ÍNDICE

- II. ABREVIATURAS
- III. RESUMEN
- IV. INTRODUCCIÓN
- V. OBJETIVOS
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSIÓN
- IX. CONCLUSIONES
- X. BIBLIOGRAFÍA
- XI. ANEXOS

I. ÍNDICE	1
II. ABREVIATURAS	7
III. RESUMEN	13
IV. INTRODUCCIÓN	17
1- CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES	19
1.1- Propiedades inmunosupresoras de las MSC	22
1.2- Mecanismos y factores implicados en las propiedades inmunosupresoras de las MSC.....	24
2- APLICACIONES DE LAS PROPIEDADES INMUNOSUPRESORAS DE LAS MSC PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUÉSPED	26
2.1- Trasplante de progenitores hematopoyéticos	26
2.2- Efecto de las MSC sobre el efecto injerto contra leucemia.....	31
2.3- Leucemia mieloide crónica	33
V. OBJETIVOS	35
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	39
1- CÉLULAS MESENQUIMALES HUMANAS (hMSC)	41
1.1- Obtención y cultivo de hMSC derivadas de médula ósea y de tejido adiposo	41
1.2- Capacidad de diferenciación de las hMSC.....	41
1.2.1- Diferenciación adipogénica	41
1.2.2- Diferenciación osteogénica	41
1.3- Inmunofenotipo de las hMSC	42
2- ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> CON MSC HUMANAS	42
2.1- Co-cultivos de hMSC y linfocitos T	42
2.1.1- Ensayo de proliferación de los linfocitos T frente a mitógeno.....	42
2.1.2- Cultivos mixtos linfocitarios	43
2.1.3- Valoración de citoquinas y factores solubles	43
2.1.4- Ensayo de inhibición de PGE ₂	43
2.1.5- Determinación de factores de transcripción	44
2.2- Co-cultivos de hMSC y Células Dendríticas	44

2.2.1- Células dendríticas mieloides (CD-m)	44
2.2.1.1- Generación de CD-m inmaduras	44
2.2.1.2- Co-cultivos de CD-m y hMSC	44
2.2.1.3- Valoración de citoquinas y factores solubles	45
2.2.1.4- Ensayo de inhibición de PGE ₂	45
2.2.1.5- Análisis de inmunofenotipo de CD-m	45
2.2.2- Células dendríticas plasmocitoides (CD-p)	45
2.2.2.1- Generación de CD-p inmaduras	45
2.2.2.2- Co-cultivos de CD-p y hMSC	45
2.2.2.3- Valoración de citoquinas y factores solubles	46
2.2.2.4- Ensayo de inhibición de PGE ₂	46
2.2.2.5- Análisis de inmunofenotipo de CD-p	46
3- CÉLULAS MESENQUIMALES DE RATÓN	46
3.1- Obtención y cultivo de MSC derivadas de tejido adiposo (mMSC-Ad).....	46
3.2- Capacidad de diferenciación de las mMSC.....	47
3.2.1- Diferenciación adipogénica	47
3.2.2- Diferenciación osteogénica	47
3.3- Inmunofenotipo de las mMSC	47
4- ENSAYOS <i>IN VITRO</i> CON mMSC	48
4.1- Co-cultivos de mMSC y esplenocitos	48
4.1.1- Obtención de esplenocitos	48
4.1.2- Ensayo de proliferación de los linfocitos T frente a mitógeno.....	48
5- GENERACIÓN DE CÉLULAS DE RATÓN LEUCÉMICAS	48
5.1- Obtención y purificación de células hematopoyéticas de ratón	48
5.2- Producción de sobrenadantes retrovirales	49
5.3- Generación de células leucémicas de ratón mediante transducción retroviral.....	50
5.4- Cultivos mixtos con células progenitoras hematopoyéticas leucémicas	50
6- ENSAYOS <i>IN VIVO</i>: MODELOS ANIMALES	50
6.1- Animales de experimentación	50
6.2- Modelo de ratón de trasplante haploide de progenitores hematopoyéticos	51
6.3- Modelo de ratón de leucemia mieloide crónica	51
6.4- Modelo de ratón de recaída de leucemia mieloide crónica	51
6.5- Modelo de ratón de enfermedad injerto contra huésped	52
6.5.1- Infusión de mMSC en el modelo de ratón de EICH.....	52

6.6- Modelo de ratón de efecto del injerto contra leucemia	52
6.6.1- Infusión de mMSC en el modelo de ratón de ICL.....	52
6.7- Grupo control de irradiación	53
6.8- Seguimiento de los modelos animales	53
6.8.1- Análisis hematológico	54
6.8.2- Análisis mediante citometría de flujo.....	54
6.8.2.1- Análisis de la sangre periférica.....	54
6.8.2.2- Análisis de la médula ósea.....	55
6.8.3- Análisis histológicos.....	55
6.8.4- Análisis inmunohistoquímicos	55
7- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	56
VII. RESULTADOS	57
1- EL FENOTIPO Y LA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN DE LAS hMSC	
OBTENIDAS DE TEJIDO ADIPOSO SON SIMILARES A LAS hMSC	
OBTENIDAS DE MÉDULA ÓSEA	59
1.1- Expansión y caracterización de las hMSC-Ad y hMSC-MO.....	59
1.2- Diferenciación a tejido óseo y tejido adiposo de las hMSC-Ad y hMSC-MO	61
2- LAS hMSC TIENEN EFECTOS INMUNOSUPRESORES SOBRE LAS	
PRINCIPALES POBLACIONES DEL SISTEMA INMUNE IMPLICADAS EN	
EICH	62
2.1- Las hMSC inhiben la respuesta inmune de los linfocitos T.....	62
2.1.1- Las hMSC inhiben la proliferación de los linfocitos T en respuesta a	
mitógenos y a estímulos alogénicos	62
2.1.2- PGE ₂ es un factor soluble responsable del efecto inhibitor de las hMSC	
sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos T	64
2.1.3- Las hMSC cambian el perfil de secreción de citoquinas de los linfocitos T	
activados	67
2.1.4- El bloqueo de PGE ₂ inicialmente sólo restaura los niveles de IL-10 en los	
co-cultivos de MSC con linfocitos T activados con PHA	69
2.1.5- Las hMSC modifican la expresión de ARNm de los factores implicados	
en la diferenciación de Th1/Th2 de los linfocitos T activados	69
2.2- Las hMSC tienen efectos inmunosupresores sobre las células dendríticas mieloides	
y células dendríticas plasmocitoides	72

2.2.1- Las hMSC impiden la maduración de las CD-m y CD-p.....	72
2.2.2- PGE ₂ es el factor soluble que media en el efecto de las hMSC sobre la maduración de las CD-p	75
2.2.3- El efecto de las hMSC sobre la maduración de las CD impide una correcta estimulación de los linfocitos T.....	79
3- LAS MSC OBTENIDAS DE TEJIDO ADIPOSO DE RATÓN TIENEN CARACTERÍSTICAS SIMILARES A LAS MSC-AD HUMANAS.....	80
3.1- Expansión y caracterización de las mMSC-Ad.....	80
3.2- Diferenciación a tejido óseo y tejido adiposo de las mMSC-Ad	81
3.3- Las mMSC-Ad tienen efectos inmunosupresores sobre la respuesta inmune de los linfocitos T.....	81
4- LA ADMINISTRACIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS <i>BCR/ABL</i>⁺ EN UN TRASPLANTE HAPLOIDÉNTICO EN RATÓN GENERA UN CUADRO SIMILAR A UNA RECAÍDA DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA	82
4.1- Generación de progenitores hematopoyéticos leucémicos mediante transducción retroviral	83
4.2- Desarrollo de un modelo de ratón de recaída de LMC	84
5- LA INFUSIÓN DE LINFOCITOS T HAPLOIDÉNTICOS EN UN MODELO DE RATÓN DE RECAÍDA LEUCÉMICA IMPIDE EL DESARROLLO DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA	91
5.1- Desarrollo de un modelo de ratón de EICH en trasplante haploidéntico.....	91
5.2- Desarrollo de un modelo de ratón de efecto injerto contra leucemia	92
6- LAS mMSC INFUNDIDAS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE EFECTO INJERTO CONTRA LEUCEMIA TIENEN UNA EFICACIA REDUCIDA EN LA PREVENCIÓN DE EICH	96
6.1- La infusión de mMSC previene el desarrollo de EICH en el modelo de ratón de trasplante haploidéntico.....	96
6.2- Las mMSC tienen menor eficacia para prevenir el EICH en un modelo de ratón de ICL.....	97
6.3- El oncogén <i>BCR/ABL</i> aumenta la respuesta proliferativa de los linfocitos T <i>in vitro</i>	101
VIII. DISCUSIÓN	103

1- EFECTOS INMUNOSUPRESORES DE LAS MSC.....	105
1.1- Generación y caracterización de MSC obtenidas de tejido adiposo y de médula ósea	105
1.2- Efectos inmunosupresores de las MSC-Ad y de las MSC-MO sobre los linfocitos T.....	106
1.3- Efectos de las MSC-Ad y de las MSC-MO sobre la maduración de las células dendríticas.....	109
2- DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE EFECTO INJERTO CONTRA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA	110
3- ESTUDIO DEL IMPACTO DE LAS PROPIEDADES INMUNOSUPRESORAS DE LAS MSC SOBRE EL EFECTO INJERTO CONTRA LEUCEMIA	112
IX. CONCLUSIONES.....	115
X. BIBLIOGRAFÍA	119
XI. ANEXOS	129

II

I. ÍNDICE

II. ABREVIATURAS

III. RESUMEN

IV. INTRODUCCIÓN

V. OBJETIVOS

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VII. RESULTADOS

VIII. DISCUSIÓN

IX. CONCLUSIONES

X. BIBLIOGRAFÍA

XI. ANEXOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ABL	Gen de Abelson.
Ad	Tejido adiposo.
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	ARN mensajero.
BCR	Gen de región de fractura (<i>breakpoint cluster region gene</i>).
BSA	Seroalbúmina bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>).
C	Curio.
c.p.m.	Cuentas por minuto.
Ca²⁺	Calcio.
CD	Células dendríticas.
CD-m	Células dendríticas mieloides.
CD-p	Células dendríticas plasmocitoides.
CFU-F	Unidad formadora de colonias de fibroblastos.
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad.
CML	Cultivo mixto de linfocitos T.
CMN	Células mononucleadas de sangre periférica.
ConA	Concanavalina A
COX	Enzima ciclooxygenasa.
Da	Dalton.
DAB	Diaminobencidina.
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dubelcco's modified Eagle medium</i>).
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético (<i>etilendiamintetracetic acid</i>).
EICH	Enfermedad injerto contra huésped.
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked immunosorbent assay</i>)
FLT-3	Tirosina quinasa-3 similar a fms (<i>fms-like tyrosine kinase-3</i>)
CSF-GM	Factor estimulador de colonias granulo-macrofágicas (<i>Granulomacrophagic colony stimulating factor</i>).
Gy	Grays.
h	Horas.
H&E	Hematoxilina/Eosina.

HGH	Hormona de crecimiento humana (<i>human growth factor</i>)
HLA	Antígenos leucocitarios humanos (<i>Human leukocyte antigen</i>).
hMSC	Células mesenquimales estromales humanas (<i>human mesenchymal stromal cells</i>).
ICL	Injerto contra leucemia.
IDM	Indometacina.
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenasa.
IFN	Interferón.
IL	Interleuquina.
ILD	Infusión de linfocitos T del donante.
IMDM	Medio de cultivo Dulbecco modificado por Iscove (<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>).
IP	Yoduro de propidio.
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma (<i>Internal ribosome entry site</i>).
ISCT	<i>International Society for Cell Therapy</i>
LIF	Factor inhibidor de leucemia.
Lin⁻	Células negativas a marcadores de linaje.
LMC	Leucemia mieloide crónica.
LPS	Lipopolisacárido
LTR	Secuencias repetidas largas de los extremos (<i>Long terminal repeats</i>).
mMSC	Células estromales mesenquimales de ratón (<i>murine mesenchymal stromal cells</i>).
MO	Médula ósea.
MSC	Células estromales mesenquimales (<i>mesenchymal stromal cells</i>).
NGFR	Receptor del factor de crecimiento nervioso (<i>Nerve growth factor receptor</i>).
NK	<i>Natural killer</i> .
ns	No significativa.
PBA	PBS/0,1% BSA.
PBS	Solución salina tamponada con fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).
PD1	Molécula de muerte celular programada 1 (<i>Programmed death 1</i>).
PGE2	Prostaglandina E2.
PHA	Fitohemaglutinina.

p/v	Peso/volumen.
Q-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real.
r.p.m.	Revoluciones por minuto.
rLMC	Recaída de LMC.
mSCF	<i>Stem cell factor</i> de ratón (<i>murine stem cell factor</i>).
RPMI	Medio del <i>Roswell Park Memorial Institute</i> .
SBF	Suero bovino fetal.
SCF	<i>Stem cell factor</i> .
SD	Desviación estándar (<i>Standard deviation</i>).
SP	Sangre periférica.
TGF-β	Factor de crecimiento tumoral beta (<i>Tumor Growth Factor beta</i>)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa (<i>tumoral necrosis factor alpha</i>).
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos.
Vs.	<i>Versus</i> .
V/V	volumen/volumen.
^3H	Timidina tritiada.

III

- I. ÍNDICE
- II. ABREVIATURAS
- III. RESUMEN**
- IV. INTRODUCCIÓN
- V. OBJETIVOS
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSIÓN
- IX. CONCLUSIONES
- X. BIBLIOGRAFÍA
- XI. ANEXOS

Mesenchymal stromal cells (MSC) are non hematopoietic multipotent cells that can be obtained from different tissues, including bone marrow (BM-MSC) and adipose tissue (Ad-MSC). MSC are part of the bone marrow stroma, secrete a large amount of factors and cytokines, and differentiate into several tissues. MSC have unique immunosuppressive effects that have been used successfully to treat Graft-vs-Host-Disease (GVHD), a potentially severe complication of allogeneic hematopoietic stem cell transplants (allo-HSCT) mediated by donor's T lymphocytes.

Our first objective was to investigate the soluble factors mediating the immunosuppressive properties of MSC over the main immune populations involved in GVHD. In activated T cells culture, the addition of MSC prevented their proliferation and changed their proinflammatory cytokine secretion profile to an anti-inflammatory one. In these co-cultures, MSC secreted high concentrations of PGE₂ and its blockade restored T cell proliferation, confirming PGE₂ implication in the MSC inhibitory effects. MSC also inhibited the maturation of myeloid (m-DC) and plasmacytoid (p-DC) dendritic cells, evidenced by their immunophenotype and cytokine secretion. The blockade of PGE₂ detected in these co-cultures, gave way to the maturation of p-DC, but not of m-DC. This points PGE₂ as a mediator of MSC effects over p-DC maturation.

We have previously described that MSC prevented GVHD in a haploidentical HSCT mouse model. GVHD is closely associated with the beneficial Graft-vs-Leukemia effect (GVL), in which donor's T lymphocytes recognize malignant cells antigens, and destroy them. Thus, an immunosuppression by decreasing T lymphocytes' allo-reactivity could favour the development of the residual malignant disease after allo-HSCT. To investigate if MSC could impair the GVL effect, we developed a CML relapse mouse model by infusing *BCR/ABL*-transduced syngenic BM Lin⁻ cells together with haploidentical BM cells. This generated a CML relapse-like syndrome. The infusion of haploidentical T lymphocytes prevented CML development because of a GVL effect, and animals died of GVHD. Strikingly, the additional infusion of MSC could not control GVHD, although no increase in leukemic cells or leukemic relapses was observed. The intense T lymphocytes' response against *BCR/ABL* detected *in vitro* could explain the reduced ability of MSC to prevent GVHD in a leukemic context.

Las células estromales mesenquimales (MSC) son células multipotentes que pueden ser obtenidas de tejidos como la médula ósea y el tejido adiposo. Forman parte del estroma de la MO, secretan gran cantidad factores y citoquinas y diferencian *in vitro* hacia numerosos tejidos. Poseen propiedades inmunosupresoras únicas, siendo utilizadas con éxito para tratar la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), complicación severa de los trasplantes de progenitores hematopoyéticos alogénicos (alo-TPH) mediada por los linfocitos T del donante.

Nuestro primer objetivo fue investigar factores solubles implicados en las propiedades inmunosupresoras de las MSC sobre las principales poblaciones del sistema inmune implicadas en el desarrollo del EICH. Las MSC en co-cultivo con linfocitos T activados inhibieron su proliferación y cambiaron su secreción de citoquinas de un perfil pro-inflamatorio a otro anti-inflamatorio. En estos co-cultivos se detectaron altos niveles de PGE₂, y su bloqueo restauró la proliferación de los linfocitos T, confirmando su implicación en los efectos inhibitorios de las MSC. Las MSC también inhibieron la maduración de las CD mieloides (CD-m) y CD plasmocitoides (CD-p), demostrado por su inmunofenotipo y perfil de secreción de citoquinas. El bloqueo de la PGE₂ en estos co-cultivos permitió la maduración de las CD-p pero no la de las CD-m. Esto indica que PGE₂ participa en la inhibición de las MSC sobre la maduración de las CD-p.

Habíamos demostrado previamente que las MSC previenen el EICH en un modelo de TPH haploidéntico de ratón. El EICH está estrechamente asociado al efecto beneficioso injerto contra leucemia (ICL), en el que los linfocitos T del donante reconocen antígenos de células malignas, eliminándolas. Una inmunosupresión podría favorecer el desarrollo de la enfermedad maligna al disminuir la alorreactividad de los linfocitos T. Para investigar si las MSC podía afectar el efecto ICL, desarrollamos un modelo de ratón de recaída de leucemia mieloide crónica (LMC) infundiendo progenitores hematopoyéticos singénicos, transducidos con el oncogén *BCR/ABL*, junto con progenitores de donantes haploidénticos. Esto generó un síndrome mieloproliferativo similar a una recaída de LMC. Al infundir esplenocitos haploidénticos se desarrolló un efecto ICL que previno la LMC, y los animales murieron de EICH. En este modelo se infundieron MSC que, sorprendentemente, no controlaron el EICH pero tampoco favorecieron un evidente desarrollo leucémico. La intensa respuesta de los linfocitos T detectada *in vitro* frente a las células con el oncogén *BCR/ABL* podría explicar la reducida eficacia de las MSC para controlar el EICH en un contexto leucémico.

IV

- I. ÍNDICE
- II. ABREVIATURAS
- III. RESUMEN
- IV. INTRODUCCIÓN**
- V. OBJETIVOS
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSIÓN
- IX. CONCLUSIONES
- X. BIBLIOGRAFÍA
- XI. ANEXOS

1- CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES

Las células madre mesenquimales o células estromales mesenquimales (MSC), fueron identificadas por primera vez en la médula ósea (MO) por Friedenstein y colaboradores que las describieron como una población adherente, de aspecto fibroblastoide, con capacidad de generar unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F)¹. Tradicionalmente se las ha descrito formando parte del estroma de la médula ósea, donde representan el 0,01-0,001% de la celularidad total. En la médula ósea las MSC participan de forma dinámica en el desarrollo del microambiente medular^{2,3}, evidenciado por su secreción de colágeno, fibronectina, laminina y proteoglicanos, implicados en la organización de la matriz extracelular. Además, las MSC, secretan gran cantidad de citoquinas y factores de crecimiento, importantes para el mantenimiento y diferenciación de las células madre hematopoyéticas²⁻⁶ (**Tabla I**).

Citoquinas y factores de crecimiento	IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-14, IL-15 LIF, SCF, FLT-3, CSF-GM
Moléculas de la matriz extracelular	Colágeno tipo I, III, IV, V, VI Fibronectina, laminina, ácido hialurónico, proteoglicanos

Tabla I: Citoquinas, factores y moléculas de la matriz extracelular secretadas por las MSC

Desde su identificación, las MSC han sido clasificadas como una población heterogénea de células madre multipotentes, con diferencias en su capacidad de proliferación y diferenciación dentro de la misma población^{2,7}. Son capaces de diferenciarse *in vitro* hacia una variedad de tejidos de origen mesodérmico, incluyendo el tejido óseo, tejido adiposo, tejido cartilaginoso, músculo y tendón^{2,8,9}, así como hacia linajes de origen no mesodérmico, como células del sistema nervioso¹⁰, miocitos¹¹ o hepatocitos¹². En la actualidad su naturaleza de célula madre es un tema de debate ya que, a pesar de su capacidad de diferenciación y de que puede obtenerse un gran número de MSC de cultivos *in vitro* partiendo de una pequeña población, alrededor del 20-25 % que se

corresponde con unas 50 duplicaciones poblacionales-, las MSC muestran signos de senescencia y apoptosis ¹³.

Además de la médula ósea, las MSC también han sido aisladas de otros tejidos, incluyendo tejido adiposo ¹⁴, placenta ¹⁵, y tejidos fetales como, hígado, bazo y cordón umbilical ¹⁶. El tejido adiposo presenta un interés especial como fuente de MSC, pues se trata de un tejido abundante y de fácil acceso en las liposucciones, del que pueden obtenerse con gran eficacia gran cantidad de MSC. La mayoría de los estudios realizados con MSC, se han llevado a cabo con células procedentes de MO (MSC-MO) y, a pesar de que las MSC derivadas de tejido adiposo (MSC-Ad) han sido menos estudiadas, es sabido que ambas poblaciones comparten muchas de sus propiedades ^{10,11,17,18}.

Las MSC no tienen un marcador de superficie específico que las defina. Expresan los marcadores de superficie Stro-1, CD63, CD49a y CD166 ¹⁹, CD29, CD44, CD73, CD105, CD106 ², moléculas de adhesión ICAM-1, CVAM-1, LFA-3, ALCAM, HCAM y VLA ⁴ y no expresan marcadores de superficie hematopoyéticos como CD34, CD45, CD14 o CD31. Además las MSC expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I (HLA-ABC) y no expresan moléculas del CMH clase II (HLA-DR).

Las distintas condiciones de cultivo utilizadas por los distintos grupos o el tiempo durante el cual las MSC son mantenidas en crecimiento en adherencia pueden variar el perfil fenotípico de las mismas ²⁰. En particular, existe controversia en la literatura científica sobre la presencia del antígeno hematopoyético CD34, pues hay estudios realizados con hMSC-Ad en los que se describe su positividad, aunque lo restringe a etapas tempranas del cultivo ^{18,21}.

Con el fin de clarificar la terminología y metodología en el estudio de las MSC, la *International Society for Cell Therapy* (ISCT) recomienda el uso de la terminología “células estromales mesenquimales” para referirse al acrónimo MSC ²². Además, con el fin de establecer unos criterios comunes, la ISCT recomienda que las MSC sean caracterizadas mediante la presencia o ausencia de determinados marcadores de

superficie además de presentar un crecimiento en adherencia y capacidad de diferenciación ²³ (**Figura 1**).

- ✓ Crecimiento en adherencia
- ✓ Inmunofenotipo CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD45⁻, CD11b⁻, CD14⁻, CD19⁻ y HLA-DR⁻
- ✓ Capacidad de diferenciación hacia tejido óseo, cartilaginoso y adiposo.

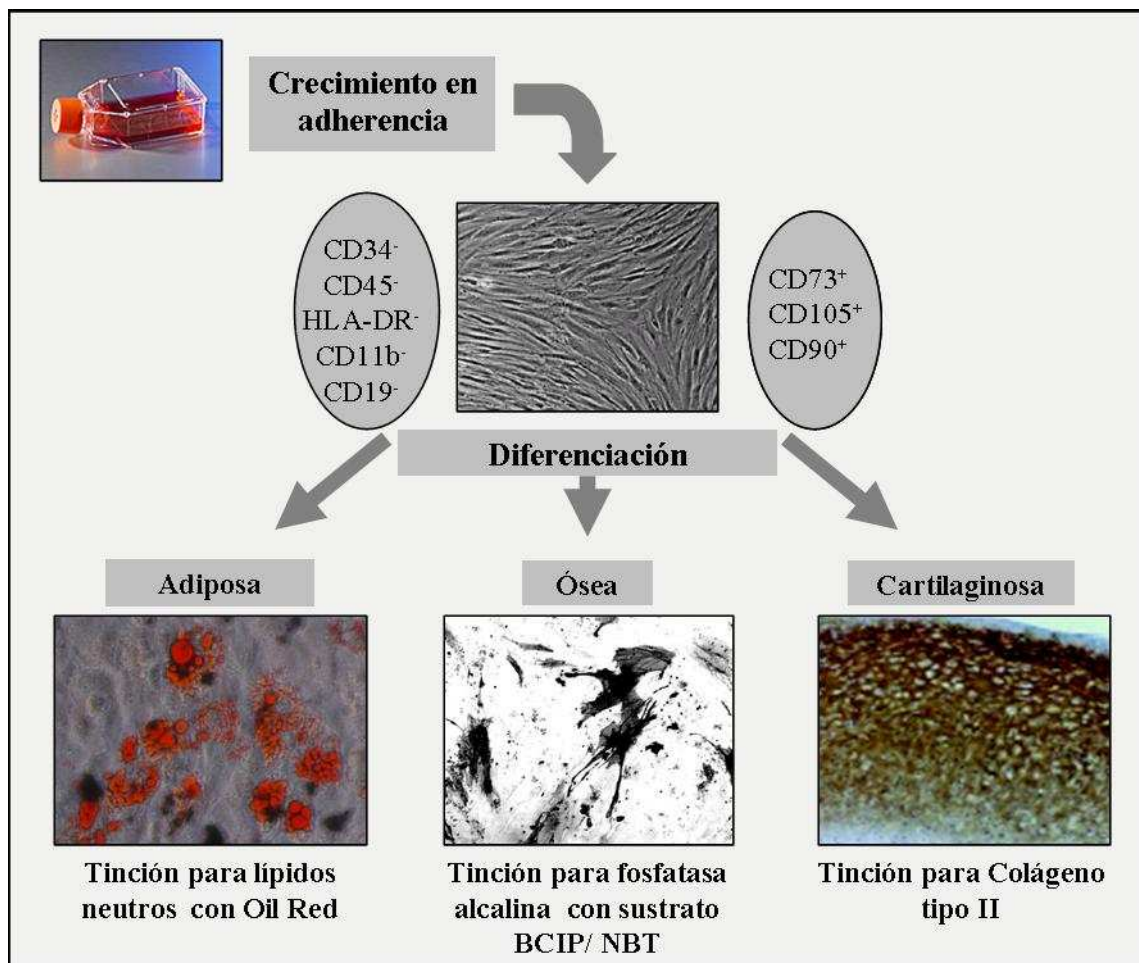


Figura 1: Criterios recomendados por la ISCT para definir a las MSC.

La capacidad de diferenciación de las MSC hacia otros tejidos de origen mesodérmico y no mesodérmico convierten a las MSC en una fuente atractiva para aplicaciones terapéuticas en el campo de la medicina regenerativa. Sin embargo, una de las aplicaciones de gran impacto se basa en las características únicas descritas para las MSC: sus propiedades para modular la respuesta inmune.

1.1- Propiedades inmunosupresoras de las MSC

Las MSC poseen propiedades inmunológicas únicas. Constitutivamente expresan bajos niveles en superficie de moléculas de CMH clase I y son negativas para moléculas de CMH clase II y para moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 o CD86, escapando al reconocimiento de linfocitos T alogénicos. Aunque la estimulación de las MSC con estímulos inflamatorios, como el IFN- γ , origina un aumento en la expresión de moléculas CMH de clase I y II, sin embargo no desencadenan una respuesta de los linfocitos T alorreactivos mostrando el potencial no inmunogénico de las MSC ²⁴⁻²⁷.

Además de este potencial, las MSC modulan la función de las principales poblaciones del sistema inmune como las células dendríticas, linfocitos T, linfocitos B y células *natural killer* (NK) (**Figura 2**).

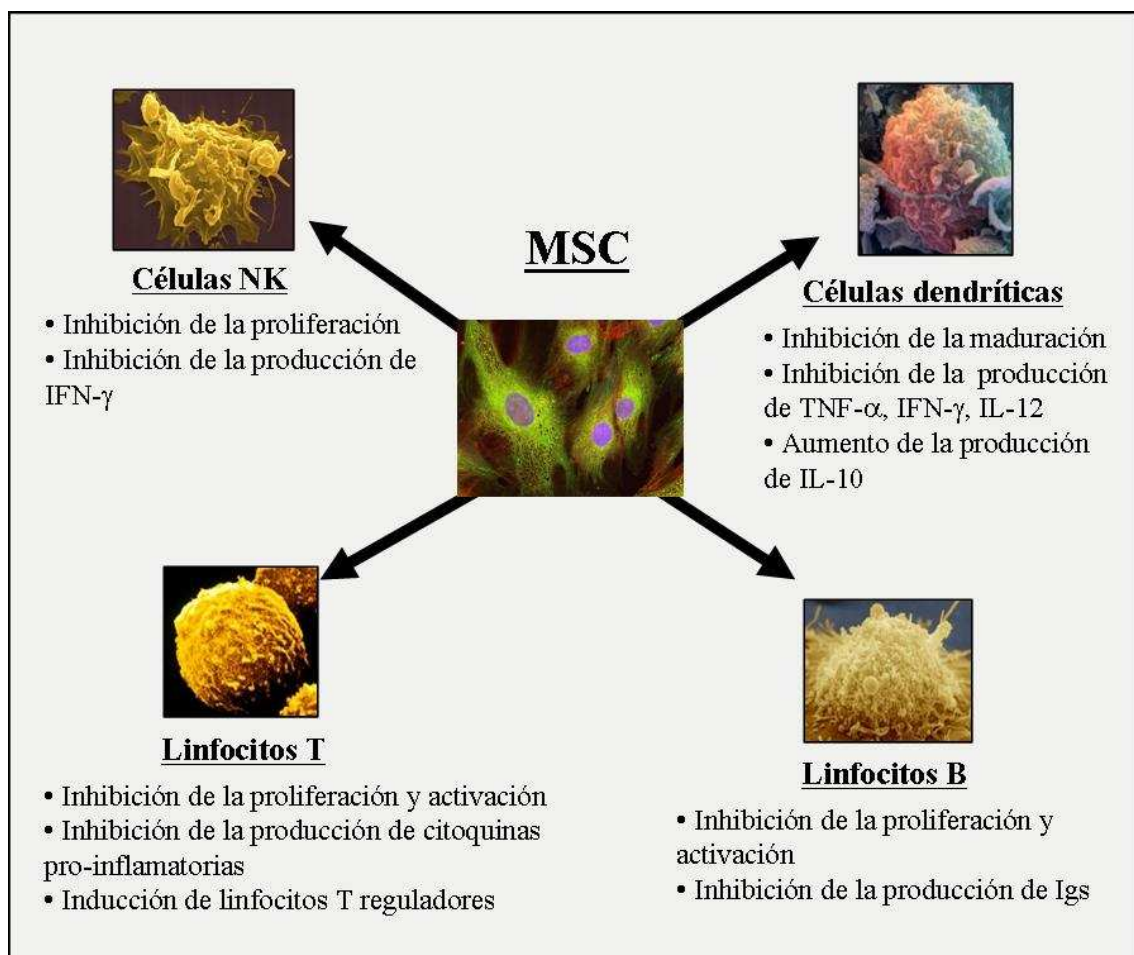


Figura 2: Efecto de las MSC sobre las distintas poblaciones del sistema inmune.

Las MSC tienen un efecto inmunosupresor sobre la activación y proliferación de linfocitos T, tanto en contextos autólogos como alogénicos ²⁸. Esta inhibición no requiere restricción por CMH y es dosis dependiente, afectando tanto a la proliferación de los linfocitos T inducida por aloantígenos ^{28,29} como a la inducida por estímulos policlonales ³⁰. Este efecto anti-proliferativo no es debido a fenómenos de apoptosis en los linfocitos T ³⁰, sino que está asociado con una parada en la fase G₀/G₁ del ciclo celular y puede ser parcialmente recuperado por una estimulación con IL-2 ³¹. Las MSC también producen un descenso en la secreción de INF- γ tanto *in vitro* ³² como *in vivo* ³¹ y un incremento en la producción de IL-4, lo que indica un cambio en el patrón de secreción de citoquinas desde un perfil pro-inflamatorio a un perfil anti-inflamatorio ^{17,18,29}. Asimismo, las MSC regulan la actividad citotóxica de los linfocitos T, sin ser ellas dianas para éstos ²⁶. También se ha descrito que las MSC inducen la generación de células T reguladoras ³³ así como su proliferación mediante la liberación del factor soluble HLA-G5 ³⁴.

Las MSC son capaces de inhibir *in vitro* la diferenciación de monocitos y de progenitores hematopoyéticos CD34⁺ hacia células dendríticas mieloides (CD-m) ³⁵⁻³⁷. Las CD-m cultivadas con MSC permanecen en un estado inmaduro caracterizado por un descenso en la expresión en la superficie celular del CMH clase II, CD83 y de moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y CD40, así como por una disminución en la producción de IL-12 ³⁸, afectando así su capacidad de presentación antigénica ³⁹. Las MSC también disminuyen la función pro-inflamatoria de las CD-m inhibiendo su producción de TNF- α ³². Las células dendríticas plasmocitoides (CD-p), que producen niveles elevados de IFN- α e IFN- β en respuesta a estímulos bacterianos, aumentan la secreción de la interleuquina anti-inflamatoria IL-10 después del cultivo con MSC ³². Se podría pensar que los efectos observados *in vitro* de las MSC sobre las CD-m y las CD-p, podrían convertirse en potentes efectos inmunomoduladores y anti-inflamatorios *in vivo*.

Aunque existen resultados contradictorios sobre los efectos de las MSC en las células B, posiblemente debidos a las diferentes condiciones experimentales usadas, la mayoría de los trabajos publicados indican que las MSC inhiben la proliferación de las células B *in vitro* ^{40,41}. Las MSC también pueden inhibir la diferenciación de las células B hacia

células secretoras de anticuerpos, en un efecto dependiente de factores solubles y del contacto célula a célula posiblemente por interacciones entre PD1 (muerte programada 1) y sus ligandos ⁴⁰. Sin embargo, otros estudios *in vitro* muestran que las MSC podrían ayudar a la supervivencia, proliferación y diferenciación hacia célula plasmática de las células B en individuos sanos y en pacientes pediátricos con lupus eritematoso sistémico ⁴². A pesar de la polémica sobre los resultados *in vitro*, hay que destacar que las mayoría de las respuestas de las células B son T-dependientes, por lo que el resultado final de la interacción *in vivo* entre las MSC y las células B podría estar influenciado significativamente por la inhibición mediada por las MSC en las funciones de los linfocitos T.

Las células NK son importantes células efectoras de inmunidad innata que desempeñan un papel principal en las respuestas inmunes anti-tumorales y anti-virales ⁴³. La función de las células NK está altamente regulada por un balance de señales de inhibición y de activación a través de receptores de superficie ⁴⁴. Las MSC pueden inhibir la actividad citotóxica de las células NK disminuyendo en superficie la expresión de los receptores NKp30 y NKG2D, receptores implicados en la activación de las células NK ⁴⁵. Las MSC inhiben la proliferación de las células NK en reposo inducida por IL-2 o IL-15 así como la producción de IFN- γ ^{45,46}. De igual manera, las células NK pre-activadas presentan una disminución en la proliferación, secreción de INF- γ y capacidad citotóxica cuando se cultivan en presencia de MSC. Sin embargo, existen resultados contradictorios en cuanto a la capacidad de las MSC singénicas y alogénicas de escapar a la lisis de las células NK activadas por citoquinas ^{45,47,48}.

1.2- Mecanismos y factores implicados en las propiedades inmunosupresoras de las MSC

Aunque numerosos estudios han demostrado las propiedades inmunosupresoras de las MSC, los mecanismos por los cuales ocurren estos efectos son poco conocidos. En estas propiedades deben colaborar tanto factores solubles como mecanismos dependientes del contacto celular. Entre factores solubles que se han propuesto como responsables de estas propiedades unos son producidos constitutivamente por las MSC (TGF- β , HGF,

IL-10, PGE₂, IL-6, HLA-G5) mientras que otros son liberados por las interacciones célula a célula, como la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y el óxido nítrico.

La IDO cataliza la conversión de triptófano a quinurenina, disminuyendo así los niveles de triptófano necesarios para la proliferación de los linfocitos T resultando de este modo en una reducción de la proliferación de los mismos ^{49,50}. Las MSC no expresan la IDO constitutivamente, pero ésta se expresa en las MSC tras la estimulación con IFN- γ ⁵¹. Las MSC-MO que expresan IDO funcional son capaces de inhibir la respuesta de los linfocitos T alogénicos en un cultivo mixto linfocitario (CML), pudiendo la proliferación de los linfocitos T ser restaurada tras la adición de triptófano al medio ⁵¹.

La PGE₂ es uno de los factores candidatos más interesantes. Es una pequeña molécula lipídica secretada constitutivamente por las MSC-MO y tiene un efecto inhibitor sobre la maduración de las CD-m y su capacidad de presentar antígenos ⁵² y también un efecto directo en la proliferación y producción de citoquinas de los linfocitos T mediante la inhibición de liberación de Ca²⁺ intracelular ⁵³ y la inhibición de la actividad tirosina quinasa de la proteína p59 ⁵⁴. Las enzimas ciclooxygenasas (COX) están implicadas en la biosíntesis de la PGE₂ (**Figura 3**) y la inhibición de su actividad mediante indometacina, disminuye los niveles de PGE₂ en los co-cultivos de MSC-MO con linfocitos T activados con mitógenos ²⁴.

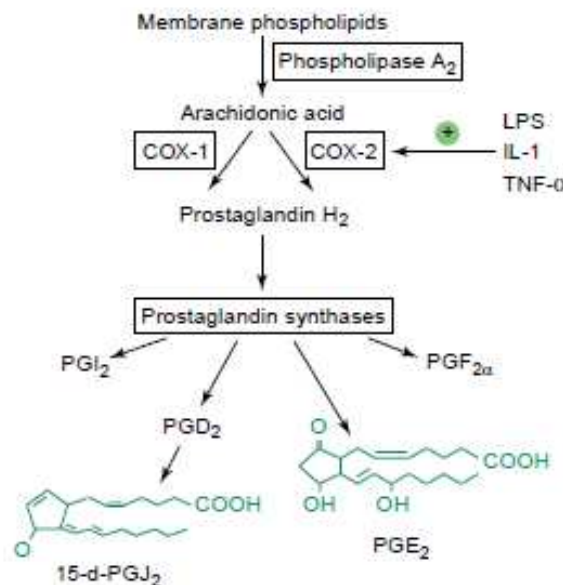


Figura 3: Ruta de la biosíntesis de prostaglandinas (extraído de Harris ⁵⁵).

Los estudios realizados con TGF- β , mostraron que el bloqueo de TGF- β secretado por las MSC-MO, resultó en la restauración de la proliferación de los linfocitos T en CML³⁰. Sin embargo, numerosos estudios han excluido que TGF- β tenga un papel único en las propiedades inmunosupresoras de las MSC-MO^{24,29}.

Otra molécula importante implicada en la regulación de la respuesta inmune por parte de las MSC-MO es HLA-G5. La producción de HLA-G5 soluble por parte de las MSC-MO suprime la proliferación de los linfocitos T así como las actividades citotóxicas de las células NK y de los linfocitos T, y favorece la generación de células T reguladoras^{34,56}. La interacción entre las MSC-MO y los linfocitos T activados produce IL-10, que tiene un papel esencial en la liberación de HLA-G5 soluble por parte de las MSC-MO⁵⁶.

2- APLICACIONES DE LAS PROPIEDADES INMUNOSUPRESORAS DE LAS MSC PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUÉSPED

2.1- Trasplante de progenitores hematopoyéticos

El trasplante de progenitores hematopoyéticos es el tratamiento de elección para muchas patologías onco/hematológicas. Consiste en la administración de un acondicionamiento de quimio/radioterapia, seguida de la infusión de progenitores hematopoyéticos para reconstituir la médula ósea afectada por el acondicionamiento (**Figura 4**). Los precursores hematopoyéticos infundidos dan lugar a todas las células de la sangre mediante eventos de proliferación y diferenciación altamente regulados.

De acuerdo a la patología de base y de la disponibilidad de un donante, una de las alternativas es la obtención de los progenitores hematopoyéticos de un donante alogénico. Una de las complicaciones más frecuentes y potencialmente severas de los trasplantes alogénicos es la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH). Esta complicación está mediada por los linfocitos T del donante que, al ser infundidos al receptor inmunosuprimido junto con los progenitores hematopoyéticos, reconocen como no propios antígenos alogénicos del receptor desencadenando una respuesta contra ellos. Las células dendríticas (CD), en su función de captación, procesamiento y

presentación antigénica a los linfocitos T, participan de forma significativa en el desarrollo del EICH.

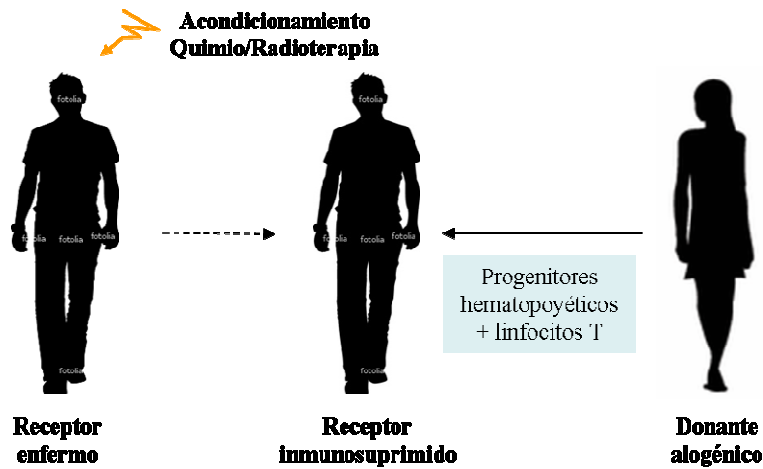


Figura 4: Esquema de un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

Esta complicación, que se asocia a una importante morbilidad y mortalidad, es un desorden inflamatorio y destructivo multiorgánico, en el que los principales órganos diana son el intestino, el hígado y la piel. La evaluación de su severidad se determina mediante una gradación que va desde 0 (ausencia de EICH) hasta IV (EICH severo) (Heymer B. Clinical and Diagnostic Pathology of Graft versus Host Disease. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2002). Para prevenir el desarrollo de EICH, se administran tratamientos inmunosupresores de forma rutinaria, pero éstos no siempre resultan eficaces, por lo que con frecuencia es necesaria la administración de corticoides seguidos de líneas adicionales de inmunosupresión. El EICH resistente a corticoides está asociado con un muy mal pronóstico para el paciente, y una esperanza de vida menor al 10% ⁵⁷⁻⁵⁹.

Las MSC modulan la función de las principales poblaciones del sistema inmune que intervienen en el desarrollo de EICH, los linfocitos T y las células dendríticas. La utilización con éxito de las MSC por primera vez, por Le Blanc y colaboradores, como tratamiento compasivo para controlar EICH aguda grado IV en un niño al que se le habían administrado cinco tratamientos inmunosupresores, constituyó un hito ⁶⁰ (**Figura 5**).

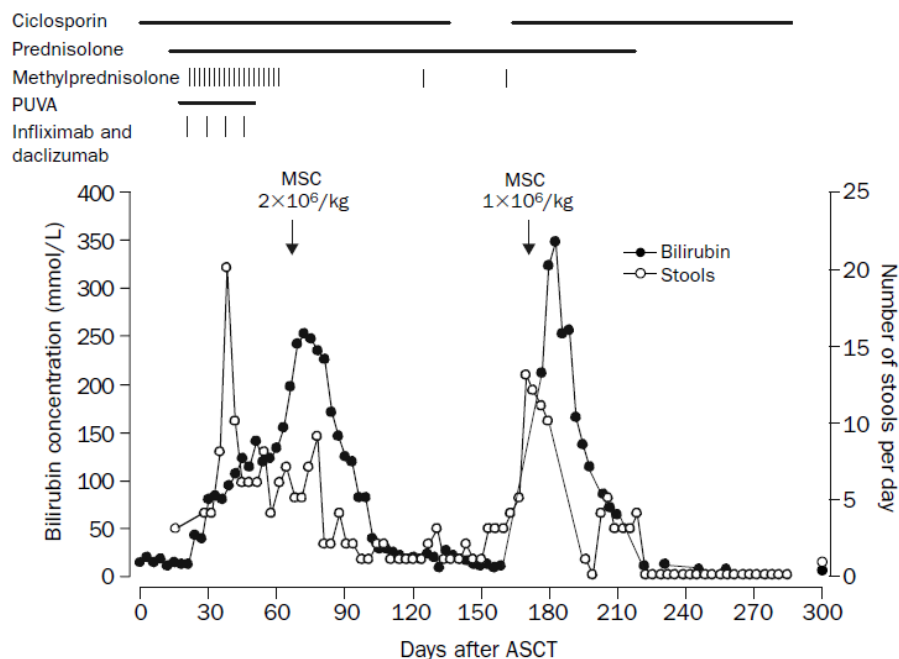


Figura 5: Curso clínico e inmunosupresión del primer paciente a quien se le administró MSC para tratar EICH severa (extraído de Le Blanc ⁶⁰).

A partir de los resultados obtenidos por Le Blanc, varios grupos han utilizado MSC para controlar EICH severa resistente a corticoides en pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos ⁶⁰⁻⁶². El más extenso de los estudios, fue realizado por el *European Group for Blood and Marrow Transplantation Developmental Committee* que utilizó un protocolo común para la expansión de MSC-MO y las aplicó para el tratamiento de pacientes con EICH resistente a corticoides en un estudio multicéntrico en fase II ⁶¹. En este estudio un total de 55 pacientes de diferentes edades y con diferentes enfermedades hematológicas recibieron una o dos dosis de MSC-MO procedentes de donante HLA idénticos, familiares haploidénticos o donantes no emparentados. Hasta la fecha, ningún paciente ha mostrado efectos adversos tras la infusión de MSC y el resultado general ha sido un incremento significativo de la supervivencia de los pacientes comparados con aquellos que fueron tratados con tratamientos alternativos (**Figura 6**).

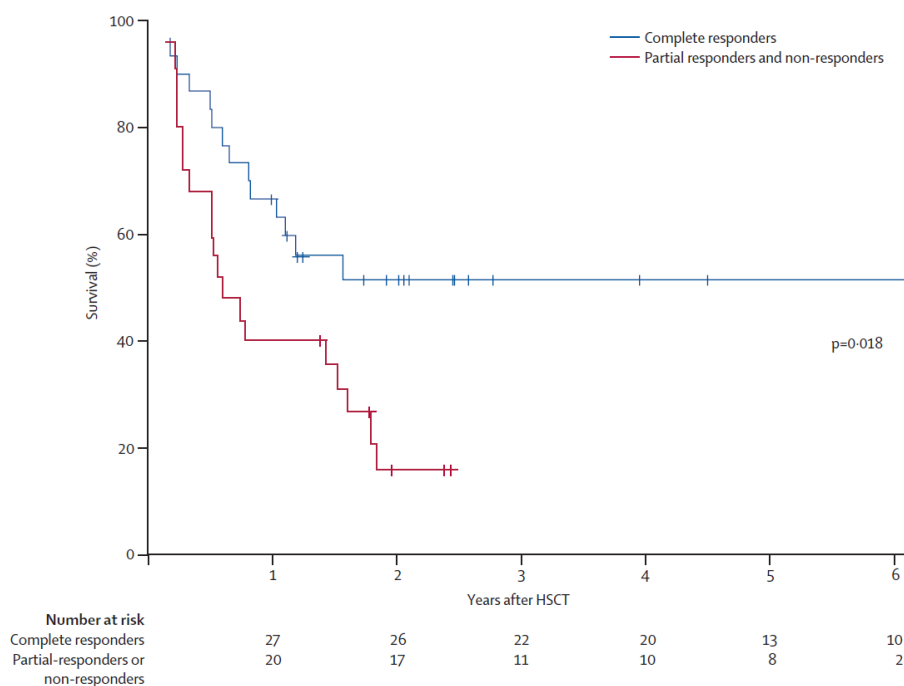


Figura 6: Supervivencia post-TPH de los pacientes a los que se les administró MSC (extraído de Le Blanc ⁶¹).

Recientemente, la compañía americana Osiris Therapeutics, Inc. publicó los resultados preliminares los ensayos multicéntricos fase III realizados con Prochymal[®], MSC-MO designadas medicamento huérfano para el tratamiento de EICH severo. En el primer ensayo clínico se infundieron MSC-MO alogénicas con el tratamiento estándar en pacientes (n=260) con EICH resistente a corticoides. En el segundo ensayo clínico, se infundieron MSC-MO alogénicas en 192 pacientes como primera línea de tratamiento en combinación con esteroides. Según los resultados obtenidos, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el uso de MSC-MO alogénicas o placebo. Sin embargo, cabe mencionar que en el ensayo clínico donde se utilizaron MSC como primera línea de tratamiento, los pacientes tenían principalmente EICH cutánea, que responde mejor a los corticoides, lo que podría haber reducido la diferencia entre el grupo tratado con MSC-MO alogénicas y el grupo control. En el ensayo clínico de EICH resistente a corticoides, la duración de la respuesta completa fue mayor, aunque no estadísticamente significativa, en el grupo tratado con MSC-MO alogénicas.

Los resultados fueron mejores en los pacientes con EICH hepática resistente a corticoides, a quienes la infusión de MSC-MO mejoró la respuesta y la duración de la misma, de manera significativa. Se detectaron también, mejores respuestas en pacientes con EICH intestinal resistente a corticoides.

Existe menos experiencia en el estudio de las MSC-Ad, sin embargo estas células también han sido utilizadas en clínica para el tratamiento de EICH aguda de hígado e intestino resistentes a corticoides obteniendo resultados exitosos^{63,64}.

A pesar de que las MSC han sido utilizadas para tratar el EICH establecido, la experiencia en clínica en su uso como prevención de EICH es menor. En el estudio realizado por Lazarus y colaboradores, 46 pacientes recibieron en co-trasplante MSC-MO expandidas *in vitro* junto al TPH. No se observaron efectos adversos derivados de la infusión de MSC-MO, sin embargo, tampoco se detectaron diferencias en la incidencia de EICH⁶⁵.

Existen estudios preclínicos utilizando modelos de ratón de TPH alogénico donde se describe que una única infusión de MSC-MO, incluso a dosis muy elevadas, no es suficiente para controlar el EICH⁶⁶. Sin embargo, en un modelo de TPH haploidéntico de ratón, nuestro grupo estudió el efecto de la infusión de MSC de ratón, en el desarrollo de EICH. Así, se demostró por primera vez, que la infusión semanal de MSC-Ad en etapas tempranas del trasplante, previno EICH severa en un contexto en el que, en ausencia de MSC, se producía la muerte de todos los receptores¹⁷ (**Figura 7**).

Este efecto fue similar cuando se utilizaron MSC de la misma cepa que el receptor o de distinta cepa. Esta última observación es de particular relevancia, pues de forma complementaria con los estudios *in vitro*, apunta a la posibilidad de utilizar a nivel clínico MSC-Ad obtenidas de donantes no relacionados y de HLA dispar con el receptor. De esta forma, se podría plantear la posibilidad de la creación de bancos de MSC-Ad a partir del producto habitualmente descartado de los lipoaspirados.

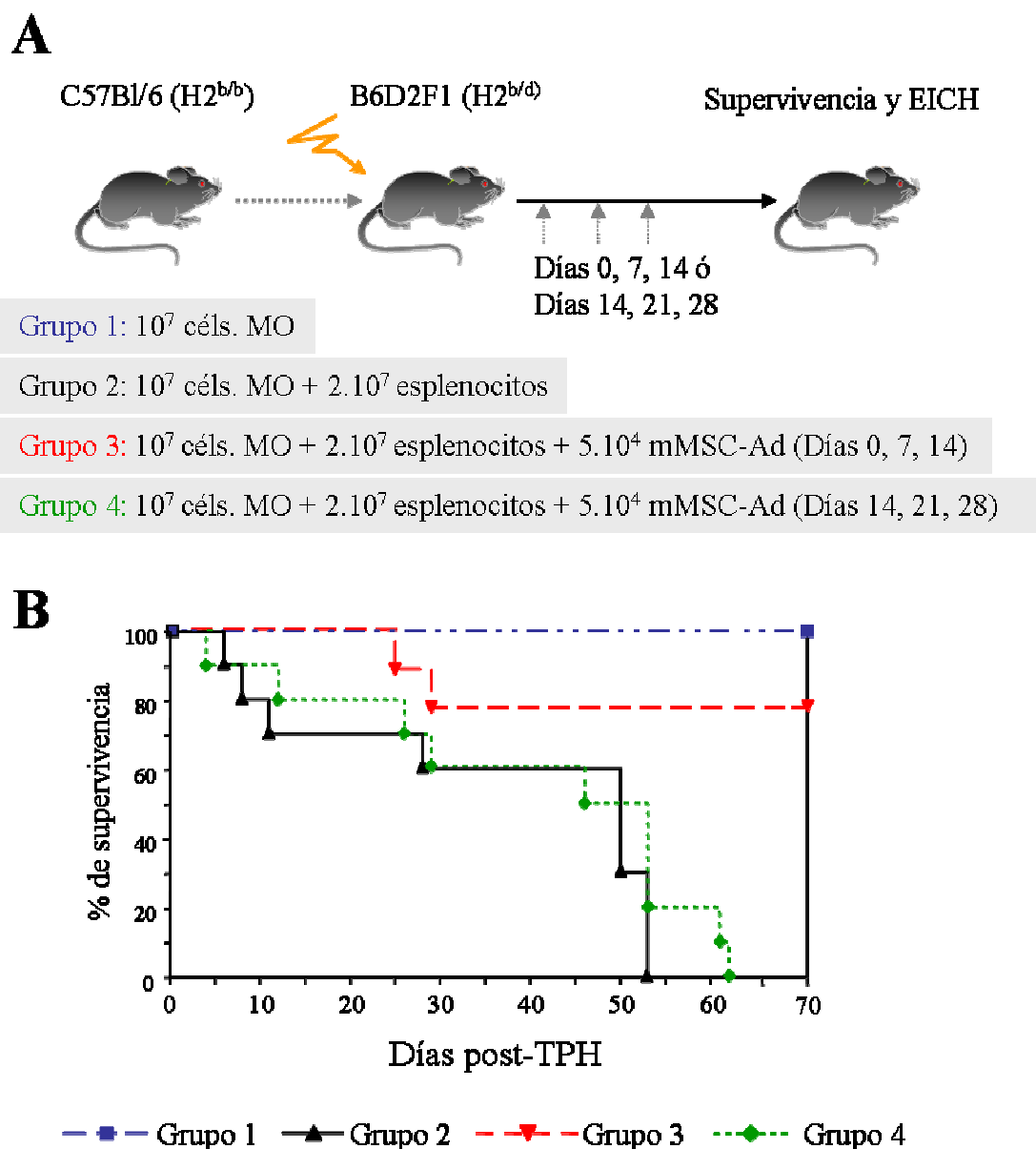


Figura 7: Efecto *in vivo* de la infusión de mMSC-Ad en la prevención de EICH después de un TPH haploidéntico en ratón. (A) Esquema del protocolo experimental (B) Curva de supervivencia de los cuatro grupos experimentales mostrando el efecto beneficioso de la infusión de mMSC-Ad en los días 0, 7 y 14 post-TPH.

2.2- Efecto de las MSC sobre el efecto injerto contra leucemia

El EICH es una de las complicaciones negativas del TPH alogénico. Sin embargo, la alorreactividad de las células inmunes del donante, particularmente de los linfocitos T, contra antígenos de las células del huésped puede incluir una alorreactividad contra

antígenos de las células malignas residuales que permanecen en el huésped después del acondicionamiento. Este fenómeno beneficioso estrechamente asociado al EICH, es el denominado efecto del injerto contra la leucemia (ICL) y tiene un papel muy importante en el control o la erradicación de la enfermedad tumoral en los pacientes sometidos a TPH alogénicos ^{67,68}. En este efecto se basa la utilización de infusiones de linfocitos T del donante (ILD) para el tratamiento de recaídas de leucemia mieloide crónica (LMC) después de un TPH alogénico ^{69,70}. En la mayoría de los estudios, el 70-80% de los pacientes en recaída leucémica tratados con ILD, obtuvieron una respuesta citogenética completa. Estas remisiones fueron permanentes, aunque el desarrollo de EICH fue frecuente. Es decir, que el efecto beneficioso ICL que contribuye con la erradicación de las células leucémicas residuales y reduce las recidivas post TPH alogénico, está estrechamente relacionado con el desarrollo de EICH severo, potencialmente mortal para los pacientes.

Existen estudios que señalan que los efectos inmunosupresores de las MSC podrían ser permisivos con el crecimiento de células tumorales. Esta observación se ha descrito en modelos animales experimentales ^{71,72}. Djouad y colaboradores demostraron usando un modelo de ratón de melanoma, que la inyección subcutánea de células B16 de melanoma eran capaces de injertar y crecer en un receptor inmunocompetente sólo cuando éstas se inyectaban junto con MSC-MO ⁷². En el contexto clínico, se ha descrito que en un paciente tratado con cinco líneas de inmunosupresión, tras la infusión de MSC para el tratamiento de un EICH grado IV resistente a corticoides, se detectó una recidiva leucémica incipiente tras la infusión de MSC-MO ⁶⁰. Sin embargo, la mayoría de los estudios clínicos no detecta una mayor incidencia de recidivas cuando se utiliza MSC para tratar EICH severa, demostrando que la mortalidad relacionada con el trasplante era menor y que la supervivencia global era más elevada. En un estudio en fase II destinado a demostrar la eficacia y seguridad de la utilización de MSC HLA idénticas y HLA dispares al receptor para el tratamiento del EICH resistente a corticoides ⁶¹ (n=55), cuatro pacientes tuvieron recidivas de su enfermedad maligna, lo que no representa un aumento comparado con grupos control. En este estudio, la mayoría de las muertes se produjeron por EICH en el grupo de pacientes sin respuesta a la infusión de MSC.

Sin embargo, si bien el uso de MSC utilizadas para tratar EICH resistente a corticoides es favorable, la utilización como tratamiento estándar para la prevención de EICH post-TPH alogénico es potencialmente cuestionable, ya que si el TPH se realiza para tratar una enfermedad oncohematológica, como la LMC, cabe la posibilidad de que el efecto beneficioso injerto contra leucemia se vea afectado.

2.3- Leucemia mieloide crónica

La leucemia mieloide crónica, es la patología en la que mejores resultados se han obtenido con el tratamiento de infusiones de linfocitos de donantes, basado en el efecto injerto contra leucemia. La LMC es un síndrome mieloproliferativo clonal de los precursores hematopoyéticos, que se origina a partir de la traslocación recíproca entre los brazos cortos de los cromosomas 9 y 22 t(9;22)(q34;q11)^{73 74}. Esta traslocación lleva a una yuxtaposición del gen *ABL* del cromosoma 9 y el gen *BCR* del cromosoma 22 resultando en el gen de fusión *BCR/ABL*, también conocido con el nombre de cromosoma Filadelfia⁷⁵ (**Figura 8A**). Este gen codifica la oncoproteína tirosina quinasa *BCR/ABL*⁷⁶. En condiciones no patológicas, el gen *ABL* codifica una proteína de 145 kDa, con actividad tirosina quinasa que tiene una función crítica en el control y proliferación celular y su actividad está altamente regulada. Sin embargo, las proteínas generadas a partir del gen de fusión *BCR-ABL* tienen actividad tirosina quinasa constitutivamente activa, transduciendo señales en numerosas vías de señalización y resultando en una interferencia en la proliferación celular⁷⁷, en la adherencia⁷⁸ y en la inhibición de apoptosis⁷⁹ (**Figura 8B**). La suma de estas alteraciones favorece la proliferación neoplásica de las células madre hematopoyéticas^{80,81}.

El desarrollo de la LMC comprende generalmente tres fases: una fase crónica, con una evolución de 3 a 6 años; una fase acelerada, con una duración aproximada de 6 a 12 meses, y finalmente una crisis blástica, que suele resultar fatal y con una duración de menos de 6 meses. Durante la fase crónica se produce una leucocitosis, caracterizada por un aumento absoluto de granulocitos en distintos estadios de maduración, astenia, médula ósea hipercelular y esplenomegalia. Con la progresión de la enfermedad, se produce un aumento de la inestabilidad genética debido a la actividad de *BCR/ABL* sobre proteínas de reparación del ADN, un bloqueo en la diferenciación, el acortamiento de telómeros y la pérdida de la función de los supresores de tumores como p53⁸²,

podría estar relacionado con la rápida evolución de la fase blástica donde los blastos constituyen alrededor del 30% de la celularidad en sangre periférica y MO. El gen de fusión *BCR-ABL* está presente en más del 95% de los casos de LMC, y es un marcador diagnóstico para la LMC ⁸³. La prueba de que el gen *BCR/ABL* es el agente causante del desarrollo de la LMC fue descrita por Daley y colaboradores mediante un modelo de ratón en el cual ratones que recibieron MO transducida con el gen de fusión *BCR/ABL* mediante un vector retroviral, desarrollaron un síndrome mieloproliferativo que recapitulaba las características de la LMC ⁷³.

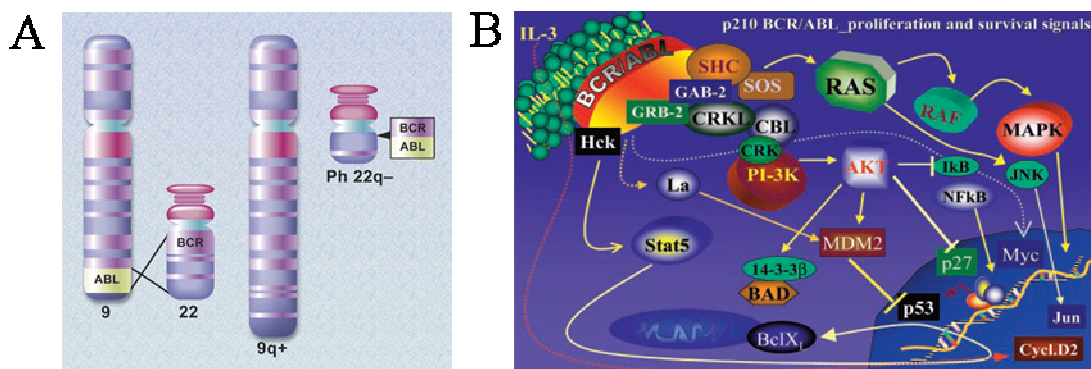


Figura 8: Esquema indicativo (A) de la traslocación causante del cromosoma Filadelfia (extraído de Druker ⁸³) y (B) vías de señalización activadas por la proteína de fusión $p210^{BCR/ABL}$ (extraído de Calabretta ⁸²).

El tratamiento convencional de la LMC incluye IFN- α , quimioterapia con busulfán o hidroxiurea, y el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) que, hasta la aparición de los recientemente introducidos inhibidores de la tirosina quinasa BCR/ABL, como el imatinib, es el único tratamiento con efecto curativo demostrado ⁸⁴.

A pesar de la eficacia de las MSC para tratar EICH severo post-TPH alogénico, se sabe poco sobre el impacto que sus propiedades inmunosupresoras pueden tener sobre el efecto ICL. Así, el efecto inmunosupresor sobre la reactividad de los linfocitos T del donante podrían abolir el efecto injerto contra leucemia, resultando en un aumento de las recidivas post-TPH.



- I. ÍNDICE
- II. ABREVIATURAS
- III. RESUMEN
- IV. INTRODUCCIÓN
- V. OBJETIVOS**
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSIÓN
- IX. CONCLUSIONES
- X. BIBLIOGRAFÍA
- XI. ANEXOS

Las células estromales mesenquimales (MSC) modulan la función de las principales poblaciones del sistema inmune implicadas en la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) que tiene lugar tras un trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico (alo-TPH). A pesar de que los mecanismos implicados en estas acciones no son del todo conocidos, las MSC han sido utilizadas como terapia celular para el tratamiento de EICH severo resistente a tratamientos convencionales. La utilización de las MSC como terapia preventiva de EICH conlleva, no obstante, un riesgo potencial, pues podría limitar el efecto beneficioso del injerto contra leucemia, esencial para la erradicación de la enfermedad residual, produciendo un aumento de las recidivas leucémicas.

Con objeto de avalar el uso terapéutico de las MSC en los alo-TPH, en esta tesis doctoral nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Identificar los mecanismos implicados en los efectos inmunosupresores de las MSC procedentes de tejido adiposo y de médula ósea sobre las poblaciones del sistema inmune implicadas en la enfermedad injerto contra huésped: los linfocitos T y las células dendríticas.
2. Desarrollar un modelo experimental para analizar el impacto de la infusión de las MSC sobre el efecto del injerto contra leucemia en un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

VI

- I. ÍNDICE
- II. ABREVIATURAS
- III. RESUMEN
- IV. INTRODUCCIÓN
- V. OBJETIVOS

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSIÓN
- IX. CONCLUSIONES
- X. BIBLIOGRAFÍA
- XI. ANEXOS

1- CÉLULAS MESENQUIMALES HUMANAS (hMSC)

1.1- Obtención y cultivo de hMSC derivadas de médula ósea y de tejido adiposo

Para generar hMSC derivadas de médula ósea (hMSC-MO) se adquirieron células mononucleadas procedentes de médula ósea de donantes sanos (Lonza, EE.UU.). Las muestras se centrifugaron 10 minutos a 1400 r.p.m. a temperatura ambiente, y la suspensión celular se resuspendió en medio MesenCult (StemCells Technologies, Canadá) suplementado con *Mesenchymal Human Supplements* (StemCells Technologies), 0,5% antibiótico (penicilina/estreptomicina, Gibco BRL, EE.UU.) y 1% L-Glutamina 200mM (Gibco BRL). Las células se sembraron a una concentración de $1,6 \times 10^5$ cel/cm² en frascos de cultivo (Nalge Nunc International, EEUU) permitiendo la adhesión celular durante 24h a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. A las 24h, se lavaron y se añadió medio completo fresco.

Las células mesenquimales de tejido adiposo (hMSC-Ad) se adquirieron ya generadas procedentes de lipoaspirado de donantes sanos (Promocel, EEUU). Las células se centrifugaron 10 minutos a 1400 r.p.m. a temperatura ambiente, se resuspendieron y sembraron en las mismas condiciones que lo descrito para las hMSC-MO.

Una vez alcanzada una confluencia del 75-80 %, las hMSC en cultivo se despegaron mediante la adición de Tripsina/EDTA 0,05% (Sigma-Aldrich, EEUU) durante 5 minutos a 37°C y 5% de CO₂. La enzima se inactivó añadiendo medio completo Mesencult y la suspensión celular se centrifugó 10 minutos a 1400 r.p.m. a temperatura ambiente. Las células se sembraron a una concentración de 4×10^3 cel/cm². El medio de cultivo se cambió dos veces por semana por medio fresco completo. Para todos los experimentos, las hMSC utilizadas fueron las recogidas entre los pases 4-7.

1.2- Capacidad de diferenciación de las hMSC

1.2.1- Diferenciación adipogénica

Se sembraron $7,5 \times 10^4$ hMSC-Ad o de hMSC-MO en placas de 35mm y se determinó su capacidad de diferenciación a tejido adiposo utilizando *NH-AdipoDiff Medium* (Miltenyi-Biotec GmbH, Alemania). A los 21 días de cultivo se valoró la presencia de gotas lipídicas teñidas con Oil Red O (Sigma-Aldrich).

1.2.2- Diferenciación osteogénica

Se sembraron $4,5 \times 10^4$ hMSC-Ad o de hMSC-MO en placas de 35mm y se procedió a su diferenciación ósea utilizando el medio de diferenciación comercial *NH-OsteoDiff*

Medium (Miltenyi-Biotec). A los 14 días de cultivo las células se tiñeron para la detección de la actividad de la fosfatasa alcalina utilizando Fast BCIP/NBT (Sigma-Aldrich).

1.3- Inmunofenotipo de las hMSC

Las hMSC se despegaron con Tripsina-EDTA 0,05%, se centrifugaron 10 minutos a 1400 r.p.m., se resuspendieron en PBA (PBS 1x + 0,1% BSA [p/v] + 0,02% NaN₃) y se incubaron alícuotas de 10⁵ células con los anticuerpos monoclonales correspondientes durante 20 minutos a 4°C. Las células marcadas se lavaron 2 veces con PBA y se resuspendieron en 300 µL conteniendo 2 µg/mL de yoduro de propidio (IP) para excluir las células no viables del análisis. La fluorescencia inespecífica se determinó mediante suspensiones celulares incubadas con anticuerpos monoclonales de isotipo IgG.

Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron: CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD166, CD34, CD11b, CD14, CD3, CD19, CD117, CD80, CD49d, CD49e, CD13, CD105, CD106, CD62L, HLA-ABC y HLA-DR (todos ellos de BD Pharmingen, EEUU). El análisis del inmunofenotipo se realizó utilizando un citómetro de flujo EPICS XL (Beckman Coulter, Fullerton, EEUU) y los datos resultantes se analizaron utilizando el software EXPO32 ADC Analysis (Applied Cytometry Systems, Reino Unido).

2- ESTUDIOS *IN VITRO* CON MSC HUMANAS

2.1- Co-cultivos de hMSC y linfocitos T

Las células mononucleadas de sangre periférica (CMN), procedentes de sangre heparinizada de donantes sanos, se obtuvieron mediante gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bioscience, Suecia). Las células obtenidas se cultivaron en RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 10% suero bovino fetal (SBF), 0,5% antibiótico y 200 mM L-Glutamina (medio completo).

2.1.1- Ensayo de proliferación de los linfocitos T frente a mitógeno

Se sembraron 10⁵ CMN, que contienen a los linfocitos T respondedores-, en 100 µL de medio completo con 10 µg/mL de fitohemaglutinina (PHA) (Sigma-Aldrich) en una placa p96 con las hMSC ya adheridas a diferentes ratios (1:1, 1:10, 1:100 hMSC:CMN). Se incubaron durante 48h a 37°C, 5% CO₂, tras las que se realizó un pulso con timidina

[³H] (1 μC) (Moravek Biochemicals, EEUU). Tras 24h se valoró la proliferación de los linfocitos T midiendo la incorporación de timidina tritiada [³H] por centelleo líquido en un contador Packard 1600TR Tri-Carb (PerkinElmer, EEUU). Los ensayos se hicieron por triplicado. Adicionalmente se recogieron los sobrenadantes antes de la adición de [³H] para analizar los niveles de IFN-γ, TNF-α, IL-10, IL-12, IL-6, IL-5 y PGE₂.

2.1.2- Cultivos mixtos linfocitarios

El cultivo mixto linfocitario (CML) se realizó sembrando 10⁵ CMN en placas p96 de fondo redondo con 10⁵ CMN alogénicas (células estimuladoras) irradiadas (15 Gys) en un volumen final de 200 μl de medio completo. Las hMSC-Ad y hMSC-MO se sembraron 18h antes a 37°C, 5% CO₂ y los CML se realizaron en ratios 1:1, 1:10, 1:100 (hMSC:CMN respondedoras). El CML con o sin hMSC se incubó a 37°C y 5% CO₂ hasta el día 6, cuando se realizó un pulso con timidina tritiada [³H] (1μC). La proliferación de los linfocitos T respondedores se midió el día 7 por centelleo líquido como se ha descrito previamente. Adicionalmente se recogieron sobrenadantes antes de la adición de [³H] para valorar IFN-γ, TNF-α, IL-10, IL-12, IL-6, IL-5 y PGE₂.

2.1.3- Valoración de citoquinas y factores solubles

Los niveles de TNF-α, IFN-γ, IL-10, IL-12, IL-6 e IL-5 se valoraron mediante un ensayo ELISA (Endogen, EEUU) en los sobrenadantes recogidos de los cultivos de CMN activados con PHA o en cultivo mixto linfocitario en presencia o ausencia de hMSC, siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Los niveles PGE₂ se cuantificaron mediante *PARAMETER™ PGE₂ Assay* (R&D Systems, EEUU), siguiendo las instrucciones de la casa comercial, en los sobrenadantes de los cultivos de CMN estimuladas con PHA, en presencia o ausencia de hMSC.

2.1.4- Ensayo de inhibición de PGE₂

Para los ensayos de inhibición de PGE₂ se utilizó indometacina (IDM), un inhibidor de la ciclooxigenasa-1, enzima que participa en la biosíntesis de las prostaglandinas. Se realizaron co-cultivos de hMSC con CMN estimulados con PHA en presencia o ausencia de indometacina (50μM, Sigma-Aldrich). La proliferación de los linfocitos T se midió tras 3 días de co-cultivo. Se recogieron sobrenadantes para valorar citoquinas y factores solubles.

2.1.5- Determinación de factores de transcripción

Se aisló ARN procedente de los linfocitos T estimulados con PHA en presencia o ausencia de hMSC utilizando el *RNAeasy kit* (Qiagen, GmbH, Alemania). El ARN se retrotranscribió con *RETROscript* (Ambion, EEUU) según las instrucciones de la casa comercial y con el ADN complementario se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR) utilizando *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, EEUU) y los oligos específicos (<http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/ezhome.html>). Las Q-PCR se realizaron en Rotor Gene RG-3000 (Corbett Research Products, EEUU) y los resultados se normalizaron de acuerdo a la expresión de β -actina y a la expresión de las muestras control según el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ⁸⁵. Se analizaron genes implicados en proliferación (PCNA, E2F1, CCNE1, CDK2), polarización Th1/Th2/Th17 (STAT1, STAT4, STAT6, T-bet, GATA3, C-MAF, ROR γ T), y citoquinas (IFN- γ , IL-5 y IL-12).

2.2- Co-cultivos de hMSC y Células Dendríticas

Para generar células dendríticas (CD) se aislaron monocitos CD14⁺ a partir de la capa leucoplaquetar (*buffy-coats*) de donantes sanos, utilizando el kit de inmunoselección *Human Monocyte Enrichment kit without CD16 depletion* (StemCell Technologies, Canadá).

2.2.1- Células dendríticas mieloides (CD-m)

2.2.1.1- Generación de CD-m inmaduras

Para la generación de CD-m inmaduras, se cultivaron células CD14⁺ durante 7 días en RPMI-1640 suplementado al que se añadió 20ng/mL CSF-GM (Chemicon Internacional, EEUU) y 20 ng/mL IL-4 (Invitrogen Corporation, EEUU). El medio de cultivo se cambió cada 3 días.

2.2.1.2- Co-cultivos de CD-m y hMSC

Se co-cultivaron 25×10^4 CD-m inmaduras con 5×10^4 hMSC-Ad o hMSC-MO (ratio 1:5). A las 48h de co-cultivo, se añadió 1mg/mL de lipopolisacárido⁸⁶ (Sigma-Aldrich Corporation) y se cultivaron durante 24h para inducir la maduración de las CD-m. Al finalizar el cultivo se estudió el inmunofenotipo de las CD-m y se recogieron sobrenadantes para valorar TNF- α , INF- γ , IL-12 y PGE₂. Se utilizaron CD-m inmaduras cultivadas con LPS sin hMSC como control de maduración.

Para ensayos de *transwell*, se sembraron 25×10^4 CD-m inmaduras en la cámara superior y 5×10^4 hMSC en la cámara inferior, separadas por una membrana de $0,4 \mu\text{m}$ de tamaño de poro (Corning Costar, EEUU). A las 48h de co-cultivo se añadió 1mg/mL de LPS y tras 24h adicionales se recogieron sobrenadantes para análisis de TNF- α , INF- γ y IL-12 para analizar el estado de maduración de las CD-m.

2.2.1.3- Valoración de citoquinas y factores solubles

Se valoraron los niveles de TNF- α , INF- γ e IL-12 mediante un ensayo ELISA (Endogen) en los sobrenadantes de las CD-m cultivadas con o sin hMSC recogidos a las 24h de la adición de LPS.

Los niveles PGE₂ se cuantificaron mediante *PARAMETER™ PGE₂ Assay* en los sobrenadantes de las CD-m cultivadas con o sin hMSC recogidos 24h después de la adición de LPS.

2.2.1.4- Ensayo de inhibición de PGE₂

Se resuspendieron CD-m inmaduras en medio completo con o sin $50 \mu\text{M}$ IDM y co-cultivadas con hMSC-Ad o hMSC-MO a los diferentes ratios. A las 48h se añadió LPS para inducir la maduración de las CD y tras 24h se recogieron los sobrenadantes para analizar los niveles de TNF- α , INF- γ , IL-12 y PGE₂.

2.2.1.5- Análisis de inmunofenotipo de CD-m

El inmunofenotipo de las CD-m se estudió en las diferentes condiciones descritas mediante citometría de flujo. Se incubaron en PBA, 30 minutos, a 4°C y en oscuridad, con los anticuerpos monoclonales CD1a, CD11a, CD11c, CD14, CD83, CD80, CD86 y HLA-DR (BD Bioscience). Las células marcadas se lavaron y se resuspendieron en una solución de PBA con $2 \mu\text{g/ml}$ de IP. La fluorescencia inespecífica se determinó mediante alícuotas incubadas con anticuerpos monoclonales de isotipo IgG.

2.2.2- Células dendríticas plasmocitoides (CD-p)

2.2.2.1- Generación de CD-p inmaduras

Para la generación de CD-p inmaduras, se cultivaron células CD14⁺ en RPMI-1640 suplementado al que se añadió 10ng/mL IL-3 (Invitrogen Corporation) durante 7 días. El medio completo se cambió cada 3 días.

2.2.2.2- Co-cultivos de CD-p y hMSC

Se sembraron 10^5 CD-p inmaduras junto con 10^5 hMSC-Ad o hMSC-MO. A las 48h del co-cultivo, se añadió 1mg/mL de LPS para inducir maduración y se mantuvo el co-cultivo 24h. Se utilizaron como control de maduración CD-p inmaduras cultivadas con

LPS sin hMSC. Se recogieron los sobrenadantes para analizar los niveles de IL-10, para valorar el estado de maduración de las CD-p.

2.2.2.3- Valoración de citoquinas y factores solubles

Los niveles de IL-10 se valoraron mediante un ensayo ELISA en los sobrenadantes de las CD-p cultivadas con o sin hMSC recogidos 24h después de la adición de LPS. Los niveles PGE₂ se cuantificaron mediante *PARAMETER™ PGE₂ Assay*.

2.2.2.4- Ensayo de inhibición de PGE₂

Se resuspendieron 10⁵ CD-p inmaduras en medio completo con o sin 50 µM IDM y se co-cultivaron 48h con 10⁵ hMSC-Ad o 10⁵ hMSC-MO. Después de 24h de la adición de LPS se recogieron los sobrenadantes para analizar los niveles de IL-10 y PGE₂.

2.2.2.5- Análisis de inmunofenotipo de CD-p

El inmunofenotipo de las CD-p se estudió en las diferentes condiciones descritas mediante citometría de flujo. Las CD-p se incubaron 30 minutos a 4°C en oscuridad con los anticuerpos monoclonales CD1a, CD11a, CD14, CD83, CD80, CD86, HLA-DR, y CD123 (BD Bioscience). Las células se lavaron y se resuspendieron en una solución de PBA conteniendo 2 µg/ml de IP. La fluorescencia inespecífica se determinó mediante alícuotas incubadas con anticuerpos monoclonales de isotipo, IgG.

3- CÉLULAS MESENQUIMALES DE RATÓN

3.1- Obtención y cultivo de MSC derivadas de tejido adiposo (mMSC-Ad)

Para generar MSC derivadas de tejido adiposo de ratón, se sacrificaron ratones B6D2F1 por dislocación cervical y se extrajo el tejido adiposo del epiplón. Las muestras se disgregaron con ayuda de un bisturí y se digirieron con 1mg/mL colagenasa A (Roche Diagnostics, Alemania) en DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL, EEUU), durante 4h a 37°C y 5%CO₂. Al cabo de 4h, las células se filtraron por un filtro de nylon de 0,40 µm (BD Bioscience, EEUU), se centrifugaron 10 minutos a 1400 r.p.m., a temperatura ambiente, y se resuspendieron en medio MesenCult (StemCells Technologies, Canadá) suplementado con *Mesenchymal Mouse Supplements* (StemCells Technologies), 0,5% antibiótico y 1% L-Glutamina 200mM. Las células se sembraron a una concentración de 1,6x10⁵ cel/cm² en frascos de cultivo para su adhesión durante 24h a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. Se lavaron y se resuspendieron en medio MesenCult completo.

El cultivo de las mMSC de ratón se realizó de la misma manera que lo descrito para las MSC humanas, utilizando el medio Mesencult con el suplemento específico para ratón. Brevemente, al alcanzar una confluencia del 75-80 %, las mMSC se despegaron con Tripsina/EDTA 0,05% durante 5 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Se añadió medio Mesencult completo y se centrifugó 10 minutos a 1400 r.p.m. a temperatura ambiente. Las mMSC se sembraron a una concentración de 4×10^3 cel/cm². El medio de cultivo completo se cambió 2 veces por semana.

3.2- Capacidad de diferenciación de las mMSC

3.2.1- Diferenciación adipogénica

Para determinar la capacidad de diferenciación de las mMSC a tejido adiposo, se sembraron 6×10^4 mMSC en placas de 35mm y se añadió medio de diferenciación compuesto por α -MEM suplementado con 10% SBF, 200 mM L-Glutamina, 0,5% antibiótico, al que se añadió 1 μ M dexametasona, 5 μ g/mL insulina y 4,5 g/L glucosa (Sigma-Aldrich). A los 21 días de cultivo, con cambio de medio cada 3 días, se valoró la presencia de gotas lipídicas teñidas con Oil Red O (Sigma-Aldrich).

3.2.2- Diferenciación osteogénica

Para determinar la capacidad de diferenciación de las mMSC a tejido óseo, se sembraron 6×10^4 mMSC en placas de 35mm y se añadió medio de diferenciación compuesto por α -MEM suplementado al que se añadió 10nM dexametasona, 10 mM β -glicerolfosfato y 50 mg/mL ascorbato-2-fosfato (Sigma-Aldrich). Se cambió el medio cada 3 días y al día 14 del cultivo se valoró la presencia de fosfatasa alcalina mediante la tinción con Fast BCIP/NBT (Sigma Aldrich)

3.3- Inmunofenotipo de las mMSC

Las células se analizaron según lo descrito para las MSC humanas, utilizando en este caso los anticuerpos monoclonales CD29, CD34, CD44, CD45.1, CD45.2, CD49d, CD73, CD80, CD86, CD90.1, CD90.2, CD105, CD117 (c-kit), CD166 y Sca-1 (BD Pharmingen).

4- ENSAYOS *IN VITRO* CON mMSC

4.1- Co-cultivos de mMSC y esplenocitos

4.1.1- Obtención de esplenocitos

Se obtuvieron esplenocitos de ratones C57Bl/6 y de ratones B6D2F1, por disgregación mecánica de los bazo s (*gentleMACS Dissociator*, Miltenyi-Biotec). Se trataron con una solución de lisis (*Red Blood Cell Lysing Buffer*, Sigma-Aldrich) para eliminar los eritrocitos. Los esplenocitos se resuspendieron a una concentración 10^6 cel/mL en DMEM suplementado con 20% SBF, 200 mM L-Glutamina, 0,5% antibiótico.

4.1.2- Ensayo de proliferación de los linfocitos T frente a mitógeno

Se sembraron 10^5 esplenocitos de ratones C57Bl/6 o de ratones B6D2F1 en 100 μ l de DMEM suplementado al que se añadió 20 μ g/mL de concanavalina-A en placa p96 con mMSC adheridas a diferentes ratios (1:1, 1:10, 1:100 mMSC:esplenocitos). Se incubaron durante 3 días a 37°C, 5% CO₂, tras las que se realizó un pulso con 1 μ C de timidina. Tras 24h se valoró la proliferación de los linfocitos T midiendo la incorporación de timidina por centelleo líquido en un contador Packard 1600TR Tri-Carb. Los ensayos se hicieron por triplicado.

5- GENERACIÓN DE CÉLULAS DE RATÓN LEUCÉMICAS

5.1- Obtención y purificación de células hematopoyéticas de ratón

Para obtener células de médula ósea se sacrificaron ratones B6D2F1 (H2^{b/d}) y ratones C57Bl/6 (H2^{b/b}) mediante dislocación cervical y se extrajeron los fémures y las tibias. La médula ósea se obtuvo perfundiendo los huesos con medio de cultivo IMDM sin suero utilizando jeringas de 1 mL con agujas de 0,5mm x 16mm para la dispersión de posibles agregados celulares. Para obtener células progenitoras hematopoyéticas se purificaron células negativas a marcadores de linaje (Lin⁻) de los ratones B6D2F1 mediante el kit comercial *Lineage Cell Depletion Kit* (Miltenyi Biotec, EEUU). Las células se incubaron 30 minutos a 4°C con la combinación de anticuerpos monoclonales biotinilados CD5, CD45R (B220), CD11b, Ly-6G (Gr-1), 7-4 y Ter-119, se lavaron con PBE (PBS con 0,5 % de albúmina de suero bovina (BSA, Fraction V; Sigma) y 5 mM de EDTA) y se incubaron con microesferas magnéticas conjugadas con estreptavidina

(*Anti-Biotin MicroBeads*; Miltenyi-Biotec). Las células marcadas con las microesferas se sometieron a separación magnética en columna siguiendo las instrucciones proporcionadas por la casa comercial (Miltenyi-Biotec).

La fracción Lin⁻, enriquecida en progenitores hematopoyéticos, se cultivó 48h a una concentración de 5×10^5 células/mL en medio IMDM suplementado con 20% SBF, 0,5% antibiótico, 200 mM L-Glutamina, al que se añadió 100 ng/mL *stem cell factor* murino (mSCF, Preprotech, Rocky Hill, EEUU) y 100 ng/mL Interleuquina-11 humana (hIL-11, R&D Systems, EEUU).

5.2- Producción de sobrenadantes retrovirales

El vector retroviral MSCVp210-ires-NGFR (**Figura 9**) que contiene el ADN complementario del oncogén humano p210 *BCR/ABL* y el gen marcador del receptor truncado del factor de crecimiento nervioso humano (Δ NGFR), fue cedido por el Dr. Warren Pear (*Department of Pathology and Laboratory Medicine, Institute for Medicine and Engineering, University of Pennsylvania, EEUU*).

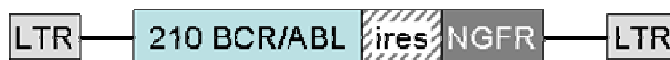


Figura 9: Esquema de la construcción retroviral MSCVp210/NGFR. Abreviaturas: LTR, repeticiones terminales largas; ires, sitio interno de entrada al ribosoma.

Los sobrenadantes retrovirales fueron producidos mediante la transfección transiente de la línea celular Nxe. Las células Nxe se sembraron 24h a una densidad de $4,5 \times 10^6$ células en placas p90 en medio de cultivo DMEM suplementado. Alcanzada una confluencia del 60-70%, se procedió a la transfección utilizando Eugene (*FuGENE Transfection Reagent*, Roche, IN, EEUU) siguiendo las instrucciones indicadas por la casa comercial. A las 24h de la transfección, se cambió el medio a las células por medio IMDM fresco suplementado y 24h después del cambio de medio, se recogieron los sobrenadantes con las partículas retrovirales, se filtraron por $0.45 \mu\text{m}$ para eliminar restos celulares y se conservaron en alícuotas a -80°C .

Los sobrenadantes conteniendo el vector retroviral MSCV-ires-NGFR, también cedido por el Dr. Warren Pear, y que codifica sólo el gen marcador Δ NGFR, fueron generados de forma similar a lo descrito para el vector retroviral MSCVp210-ires-NGFR.

5.3- Generación de células leucémicas de ratón mediante transducción retroviral.

Para la transducción de los progenitores hematopoyéticos Lin⁻, se recubrió placas de cultivo no tratadas con retronectina 20 µg/mL (Takara, Biomedicals, Japón) 2h a temperatura ambiente. Transcurridas 2h, se retiró y se añadió una precarga de sobrenadante retroviral 4h a 37°C. La precarga se retiró antes de la infección y las células se resuspendieron a una concentración de 5x10⁵ células/mL de medio completo y se agregaron en los pocillos con la precarga. Después 24h se realizó un segundo ciclo de infección añadiendo sobrenadante retroviral en una proporción V/V. Tras 24h adicionales, se lavaron las células y se analizó la expresión de NGFR por citometría de flujo antes de ser infundidas en los ratones. Muestras de las células transducidas se mantuvieron en cultivo 72h adicionales para analizar la variación de expresión de NGFR.

Para ensayos *in vitro* de cultivos mixtos con células progenitoras se generaron células Lin⁻ transducidas con el vector MSCV-ires-NGFR, de forma similar a la descrita arriba.

5.4- Cultivos mixtos con células progenitoras hematopoyéticas leucémicas

Se sembraron 10⁵ mMSC-Ad de B6D2F1 en placas p96 y se dejaron adherir 18h antes de irradiarlas con 40Gys. Las células Lin⁻ obtenidas de ratones B6D2F1 y C57Bl/6 transducidas o no con los vectores retrovirales MSCVp210-ires-NGFR o MSCV-ires-NGFR se resuspendieron en DMEM suplementado y se irradiaron a 20Gys. Para evaluar la proliferación de los linfocitos T frente a diferentes estímulos antigénicos, se co-cultivaron 10⁵ esplenocitos de ratones C57/Bl, 10⁵ células Lin⁻ transducidas o sin transducir en placas p96 en presencia o ausencia de mMSC (ratio 1:1) durante 7 días. La proliferación de los linfocitos T se evaluó mediante el ensayo *Cell Proliferation ELISA BrdU Assay* (Roche, Alemania) según las instrucciones de la casa comercial.

6- ENSAYOS *IN VIVO*: MODELOS ANIMALES

6.1- Animales de experimentación

Para los distintos estudios realizados, se utilizaron ratones (*Mus musculus*) B6D2F1 CD45.2 (H2^{b/d}) hembras y ratones C57Bl/6 CD45.1 (H2^{b/b}) machos, todos de 10-12 semanas. Las parejas reproductoras originales de cada cepa fueron obtenidas de los laboratorios Jackson (Bar Harbor, MA, EEUU). Su cría y su mantenimiento se llevaron a cabo en el Servicio del Animalario del CIEMAT (Centro de Usuarios de Animales de

Experimentación N° 28079-21A). Los ratones se mantuvieron en condiciones controladas de aire filtrado a través de filtros Hepa, humedad relativa ($55 \pm 15\%$) y temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), con ciclos de luz/oscuridad de 12h, alimentación *ad libitum* con pienso UAR A04 (UAR, Villemoisson-sur-Orge, Francia) y agua de bebida irradiada con luz ultravioleta con, al menos, 4 partes por millón de cloro residual libre.

El estado de salud de los animales se controló rutinariamente mediante análisis en animales centinelas, de acuerdo con los procedimientos recomendados por FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*). Todos los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo a la legislación europea y española vigente sobre el uso y tratamiento de animales de experimentación (Directiva Europea 86/609/CEE y RD 1201/2005) y de acuerdo a los principios éticos y de bioseguridad de nuestro centro. Asimismo, todos los procedimientos de irradiación siguieron los criterios y normas de Protección Radiológica que recoge la legislación vigente (Reglamento sobre Instalaciones Nucleares y Radiactivas Real Decreto 1836/1999 de 3 de Diciembre; Reglamento sobre Protección Sanitaria contra Radiaciones Ionizantes Real Decreto 783/2001 de 6 de Julio).

6.2- Modelo de ratón de trasplante haploidéntico de progenitores hematopoyéticos

Para generar un modelo de trasplante haploidéntico de progenitores hematopoyéticos (grupo TPH, n=17) en receptores B6D2F1 ($\text{H2}^{\text{b/d}}$) letalmente irradiados (dos dosis de 6Gy separadas 24h), se infundieron 10^7 células de médula ósea procedentes de donantes C57Bl/6 ($\text{H2}^{\text{b/b}}$). En ningún caso se detectaron signos de EICH, por lo que no se consideró necesario hacer una depleción de linfocitos T de la MO infundida. Ver **Tabla II**.

6.3- Modelo de ratón de leucemia mieloide crónica

Para generar un modelo de leucemia mieloide crónica (grupo LMC, n=28) en receptores B6D2F1 ($\text{H2}^{\text{b/d}}$) letalmente irradiados, se infundieron 10^5 células Lin^- leucémicas singénicas NGFR^+ incluidas en $1.6\text{-}2,5 \times 10^6$ células Lin^- totales. Ver **Tabla II**.

6.4- Modelo de ratón de recaída de leucemia mieloide crónica

Para generar un modelo de recaída leucémica (grupo Recaída LMC, n=31) en receptores B6D2F1 ($\text{H2}^{\text{b/d}}$) letalmente irradiados, se infundió una dosis fija de 10^5 células

leucémicas singénicas Lin⁻ NGFR⁺ -incluidas en un total de $1.6-2,5 \times 10^6$ células Lin⁻ - junto con 10^7 células de médula ósea de donantes C57Bl/6 (H2^{b/b}). Ver **Tabla II**.

6.5- Modelo de ratón de enfermedad injerto contra huésped

Se generó un modelo de Enfermedad Injerto contra Huésped (grupo EICH, n=18) según lo descrito previamente ¹⁷. La médula ósea de los ratones no contiene linfocitos T en cantidad suficiente como para producir una EICH al ser infundida en ratones haploidénticos, por lo que para generar EICH de forma reproducible es necesario infundir esplenocitos haploidénticos. Así, en receptores B6D2F1 (H2^{b/d}) letalmente irradiados, se infundieron 10^7 células de médula ósea haploidéntica junto con 25×10^6 esplenocitos haploidénticos procedentes de donantes C57Bl/6 (H2^{b/b}). Ver **Tabla II**.

6.5.1- Infusión de mMSC en el modelo de ratón de EICH

Se generó un modelo de prevención de EICH según lo descrito previamente ¹⁷ (grupo EICH + mMSC, n=20). En el modelo del grupo EICH se infundieron $2-2,5 \times 10^5$ mMSC-Ad de donantes B6D2F1 (H2^{b/d}) por vía intraperitoneal en los días 0, 7 y 14 después del trasplante. Ver **Tabla II**.

6.6- Modelo de ratón de efecto del injerto contra leucemia

Para generar un modelo de ratón de efecto injerto contra leucemia (grupo ICL, n=19) receptores B6D2F1, letalmente irradiados, fueron infundidos con 10^7 células de médula ósea de donantes C57Bl/6 (H2^{b/b}) y 10^5 células Lin⁻ NGFR⁺ B6D2F1 (H2^{b/d}) junto con 25×10^6 esplenocitos de donantes C57Bl/6 (H2^{b/b}), necesarios para generar un efecto ICL. Ver **Tabla II**.

6.6.1- Infusión de mMSC en el modelo de ratón de ICL

Para estudiar el efecto de la infusión de mMSC sobre el ICL (grupo ICL + mMSC, n=26) ratones del grupo ICL recibieron por vía intraperitoneal $2-2,5 \times 10^5$ mMSC-Ad los días 0, 7 y 14 después del trasplante. Ver **Tabla II**.

En un experimento, cinco ratones del grupo ICL recibieron las tres dosis de mMSC más cuatro dosis adicionales en los días 19, 22, 24 y 25.

6.7- Grupo control de irradiación

Para generar un grupo control de irradiación receptores B6D2F1 ($H2^{b/d}$) fueron letalmente irradiados con dos dosis de 6Gy separadas 24h sin recibir ninguna población celular. Ver **Tabla II**.

Población celular	Receptores B6D2F1 ($H2^{b/d}$) irradiados	10^5 células Lin- <i>BCR/ABL</i> singénicas	10^7 células MO haplo idénticas	2.5×10^7 esplenocitos haplo idénticos	2.5×10^5 mMSC singénicas
Origen celular		B6D2F1 $H2^{b/d}$	C57Bl/6 $H2^{b/b}$	C57Bl/6 $H2^{b/b}$	B6D2F1 $H2^{b/d}$
Día de infusión		Día 0	Día 0	Día 0	Días 0, 7 y 14
Grupos de estudio					
Irradiación	+	-	-	-	-
TPH	+	-	+	-	-
LMC	+	+	-	-	-
Recaída LMC	+	+	+	-	-
ICL	+	+	+	+	-
EICH	+	-	+	+	-
ICL + mMSC	+	+	+	+	+
EICH + mMSC	+	-	+	+	+

Tabla II: Grupos experimentales desarrollados detallando las poblaciones celulares que recibieron.

6.8- Seguimiento de los modelos animales

Se realizaron 6 experimentos incluyendo todos los grupos descritos. Se utilizaron animales de 10-12 semanas de vida y se controló su supervivencia y estado clínico cada 2-3 días. Los animales se sacrificaron mediante inhalación de CO_2 cuando presentaron un estado de salud deteriorado, determinado por un encorvamiento, movilidad reducida

y pelo encrespado. En los animales sacrificados, se observó la apariencia macroscópica de los órganos y se obtuvieron muestras de sangre periférica, médula ósea, bazo, hígado y pulmones para posteriores análisis histológicos, de citometría de flujo y de inmunohistoquímica. En los grupos experimentales donde los ratones habían recibido esplenocitos, se evaluó el grado de EICH en una gradación de 0 (ausencia de EICH) a 4 (EICH severo) según lo descrito (Heymer B. Clinical and Diagnostic Pathology of Graft versus Host Disease. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2002):

- ✓ **Piel:** Grado 0: normal. Grado I: degeneración vacuolar de las células epidérmicas basales. Grado II: espongiosis y degeneración eosinofílica de células individuales dispersas. Grado III: separación de la unión dermo-epidérmica. Grado IV: destrucción masiva de la epidermis.
- ✓ **Hígado:** Grado 0: normal. Grado I: daño epitelial y destrucción de < 25% de los ductos biliares pequeños. Grado II: daño epitelial y destrucción de 25%-49%. Grado III: daño epitelial y destrucción de 50%-74%. Grado IV, daño epitelial y destrucción de ≥ 75%.
- ✓ **Intestino:** Grado 0: normal. Grado 1: células apoptóticas en criptas o glándulas. Grado II: destrucción de criptas o glándulas. Grado III: ulceración focal de la mucosa. Grado IV: ulceración difusa de la mucosa con denudación.

6.8.1- Análisis hematológico

En la tercera semana después del trasplante, cuando la reconstitución hematopoyética lo permitía, los ratones de todos los grupos se sangraron simultáneamente una vez por semana extrayendo aproximadamente 100 µL de sangre de la vena caudal. Las muestras de sangre obtenidas se analizaron para su recuento y fórmula mediante el contador hematológico Abacus Junior Vet (Diatron, Austria).

6.8.2- Análisis mediante citometría de flujo

6.8.2.1- Análisis de la sangre periférica

La sangre periférica obtenida se analizó mediante citometría de flujo para determinar la presencia de las poblaciones hematopoyéticas y detección de células NGFR⁺. Los eritrocitos se lisaron mediante solución de lisis (0,155 mM NH₄Cl + 0,01 mM KHCO₃ + 10⁻⁴ mM EDTA), se lavaron con PBA y se marcaron 20 minutos a 4°C y en oscuridad

con los anticuerpos monoclonales Gr-1, CD11b, Ter119, CD45.2, CD45.1, B220, CD3 (BC Pharmigen) y NGFR (Miltenyi-Biotec). Las células marcadas se lavaron y se resuspendieron en una solución de PBA conteniendo 2 mg/mL de (IP) para excluir las células no viables. La fluorescencia inespecífica se determinó mediante isotipo IgG.

6.8.2.2- Análisis de la médula ósea

Se obtuvieron muestras de médula ósea para determinar el injerto y la composición de las poblaciones hematopoyéticas así como la detección de células leucémicas NGFR⁺. El análisis por citometría de flujo de la médula ósea se realizó de forma similar a lo descrito para la sangre periférica.

6.8.3- Análisis histológicos

Los órganos a analizar se fijaron en formaldehído 10 % y fueron embebidos en parafina. Se realizaron cortes histológicos (4-6 µm de espesor) con un micrótomos (Leica), se desparafinaron en una estufa a 60°C durante 30-60 minutos, se aclararon en Xilol 3 veces durante 5 minutos y se rehidrataron en soluciones acuosas con porcentajes decrecientes de etanol. Para determinar la arquitectura tisular, las secciones se tiñeron con Hematoxilina-eosina (Gill 2 Haematoxylin, Eosin Y alcoholic; Thermo Sandon, Reino Unido) siguiendo el protocolo habitual.

6.8.4- Análisis inmunohistoquímicos

Para el análisis inmunohistoquímico y la tinción con inmunoperoxidasa, los cortes fueron tratados para inactivar la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3%. Se realizó un tratamiento previo con citrato sódico 10 mM para desenmascarar los epítomos, bloqueando a continuación las uniones inespecíficas incubando los cortes con BSA al 5% en PBS conteniendo Tween 20 0.05% (Sigma-Aldrich) 30 minutos a temperatura ambiente. Los cortes histológicos se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-NGFR (ab8874, Abcam, Reino Unido) diluido en PBS 1X con Tween 20 0,05%. La detección del anticuerpo se realizó mediante el sistema avidina/estreptavidina-peroxidasa, utilizando el kit Vectastain ABC (Vector Laboratories Inc., EEUU). La localización de los anticuerpos se realizó añadiendo el sustrato DAB (Vector Laboratories) y H₂O₂. Las muestras se contratiñeron con hematoxilina y se deshidrataron en soluciones acuosas conteniendo porcentajes crecientes de etanol. Por último, los cristales fueron sumergidos 15 minutos en Histoclear (National Diagnostic, Atlanta, EEUU) y se montaron con Eukitt. Las

imágenes fueron tomadas usando una cámara digital Leica DFC420 acoplada a un microscopio Nikon, Eclipse E400.

7- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa *SPSS software package* (SPSS Inc, Chicago, EEUU). Los datos descriptivos se presentan como media más menos la desviación estándar (SD). Las comparaciones entre las diferentes condiciones se realizó utilizando el *t* test para muestras emparejadas. Los resultados se consideraron significativos si el valor *p* era menor de 0,05. Las curvas de supervivencia se analizaron con Kaplan-Meier Test y los datos hematológicos se analizaron mediante Graph Pad Prism 4.0.

VII

- I. ÍNDICE
- II. ABREVIATURAS
- III. RESUMEN
- IV. INTRODUCCIÓN
- V. OBJETIVOS
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VII. RESULTADOS

- VIII. DISCUSIÓN
- IX. CONCLUSIONES
- X. BIBLIOGRAFÍA
- XI. ANEXOS

1- EL FENOTIPO Y LA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN DE LAS hMSC OBTENIDAS DE TEJIDO ADIPOSO SON SIMILARES A LAS hMSC OBTENIDAS DE MÉDULA ÓSEA

1.1- Expansión y caracterización de las hMSC-Ad y hMSC-MO

Las hMSC humanas derivadas de tejido adiposo y de médula ósea fueron cultivadas y expandidas según lo descrito en el apartado Materiales y Métodos. El aspecto fibroblastoide característico de ambas poblaciones creciendo en adherencia puede observarse en la **Figura 10**.

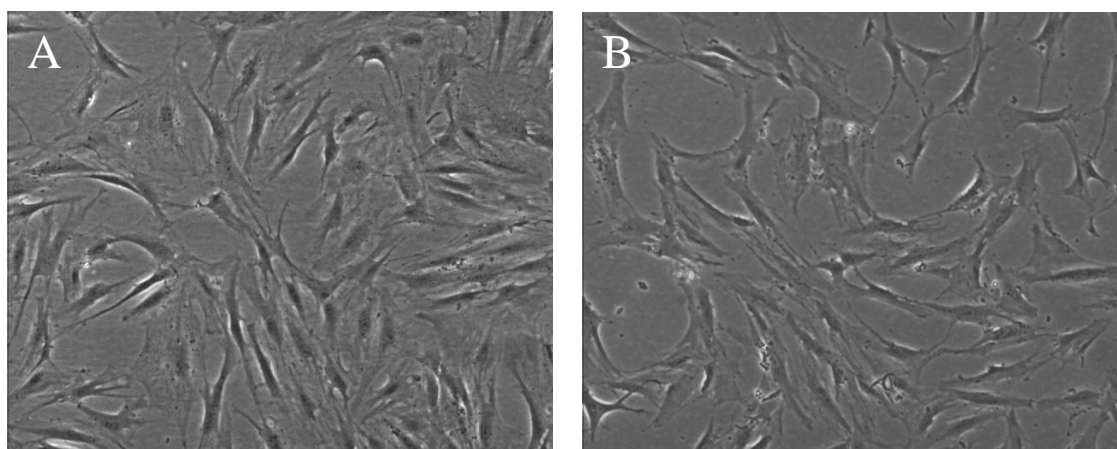


Figura 10: Cultivo de hMSC en adherencia, mostrando la morfología característica de las (A) hMSC-Ad y (B) hMSC-MO.

Debido a que las hMSC no poseen un marcador de superficie específico, para la caracterización inmunofenotípica se utilizó un amplio panel de marcadores de superficie que analiza la presencia o ausencia de determinados antígenos por citometría de flujo. En la **Tabla III** se muestra un panel completo de marcadores de superficie analizado tanto para las hMSC-Ad como para las hMSC-MO. Los resultados obtenidos mostraron que ambas poblaciones tienen un inmunofenotipo similar. Así, ambos tipos de hMSC fueron positivas para CD29, CD44, CD73, CD90, CD166 y HLA-ABC y negativas para CD34, CD31, CD45 y HLA-DR, en concordancia con lo establecido por la ISCT²³.

Marcador	hMSC-Ad	hMSC-MO
CD34	-	-
CD45	-	-
CD11b	-	-
CD14	-	-
CD31	-	-
CD3	-	-
CD19	-	-
CD117	-	-
CD80	-	-
CD49d	-	-
CD13	+	+
CD44	+	+
CD73	+	+
CD90	+	+
CD105	+	+
CD106	+	+
CD29	+	+
CD49e	+	+
CD166	+	+
CD62L	+	+
HLA-ABC	+	+
HLA-DR	-	-

Tabla III: *Inmunofenotipo de las hMSC-Ad y de las hMSC-MO.*

En la **Figura 11** se muestran los histogramas representativos de los marcadores de superficie más significativos, siendo ambos tipo celulares positivos para CD73, CD90, CD29, CD166 y CD44 y negativos para CD14, CD3, CD 45, CD34 y CD80.

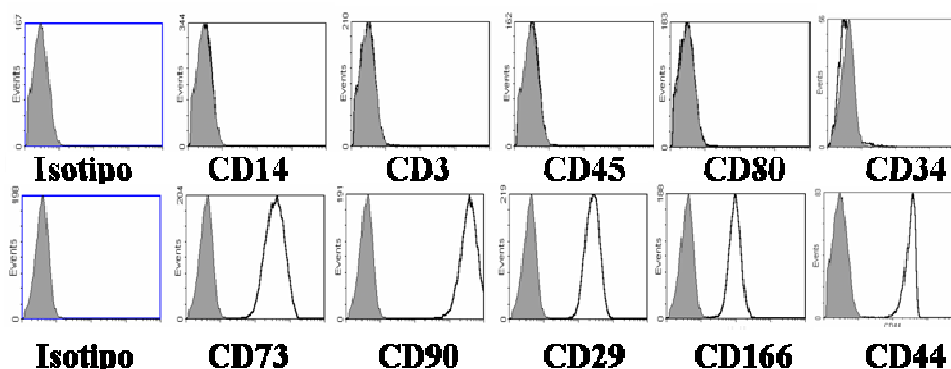
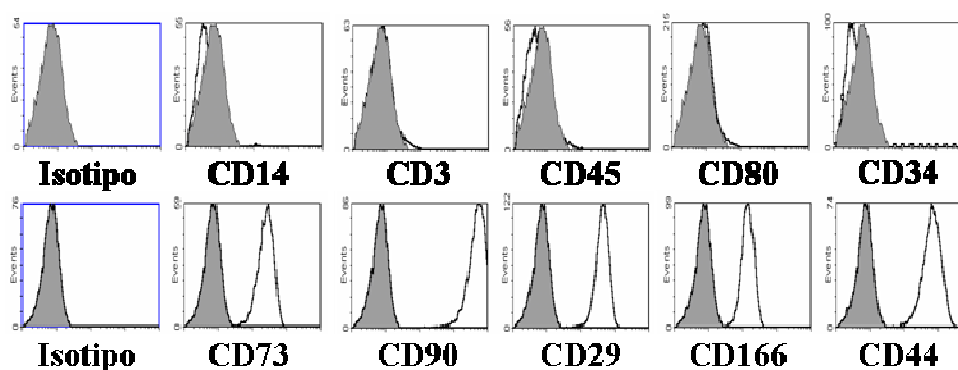
(A) hMSC-Ad**(B) hMSC-MO**

Figura 11: *Inmunofenotipo representativo de las (A) hMSC-Ad y (B) hMSC-MO.*

1.2- Diferenciación a tejido óseo y tejido adiposo de las hMSC-Ad y hMSC-MO

La capacidad de diferenciación hacia tejido óseo y adiposo, otro de los criterios utilizados para la caracterización de las hMSC, se comprobó según lo descrito en Materiales y Métodos. Tanto las hMSC-Ad como las hMSC-MO mostraron tener una capacidad similar de diferenciación osteogénica medida mediante la detección de la actividad de la fosfatasa alcalina, como puede observarse en la **Figura 12A**. Asimismo, ambos tipos celulares mostraron tener capacidad de diferenciación adipogénica, evidenciada por la presencia de gotas lipídicas teñidas con Oil Red O (**Figura 12B**).

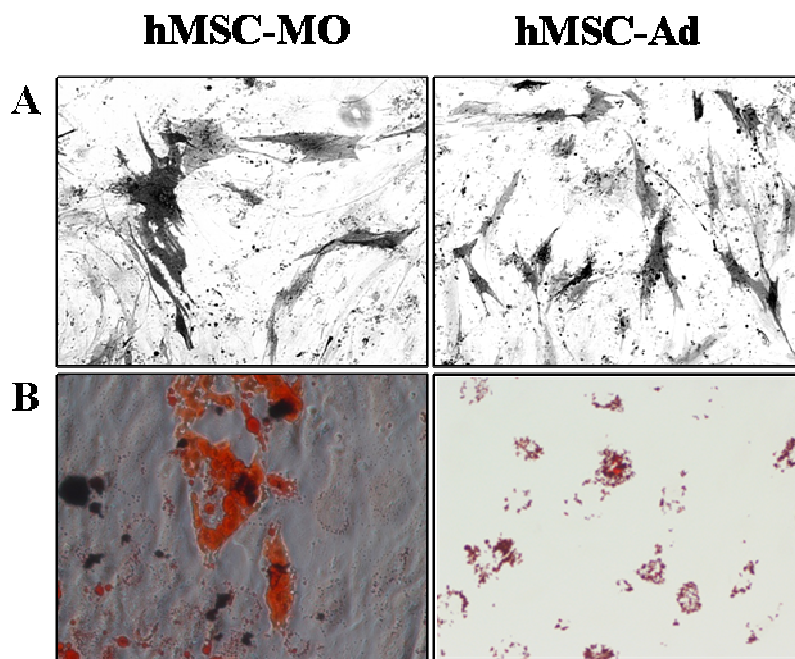


Figura 12: Diferenciación (A) osteogénica y (B) adipogénica de las hMSC-Ad y de las hMSC-MO.

2- LAS hMSC TIENEN EFECTOS INMUNOSUPRESORES SOBRE LAS PRINCIPALES POBLACIONES DEL SISTEMA INMUNE IMPLICADAS EN EICH

Nos propusimos estudiar las propiedades inmunosupresoras de las hMSC sobre dos de las principales poblaciones del sistema inmune implicadas en el EICH e identificar los mecanismos implicados en estos efectos. Así, estudiamos el efecto de las hMSC sobre las células dendríticas, que captan, procesan y presentan los antígenos a los linfocitos T, y sobre los linfocitos T, responsables de la respuesta celular.

2.1- Las hMSC inhiben la respuesta inmune de los linfocitos T

2.1.1- Las hMSC inhiben la proliferación de los linfocitos T en respuesta a mitógenos y a estímulos alogénicos

Comprobamos que tanto las hMSC-Ad como las hMSC-MO inhiben la proliferación de los linfocitos T estimulados por mitógenos, como la PHA (**Figura 13A**), y por estímulos alogénicos en un cultivo mixto linfocitario (**Figura 13B**). En ambos casos, la

inhibición de la proliferación fue dependiente de la relación hMSC:CMN e independiente del complejo mayor de histocompatibilidad.

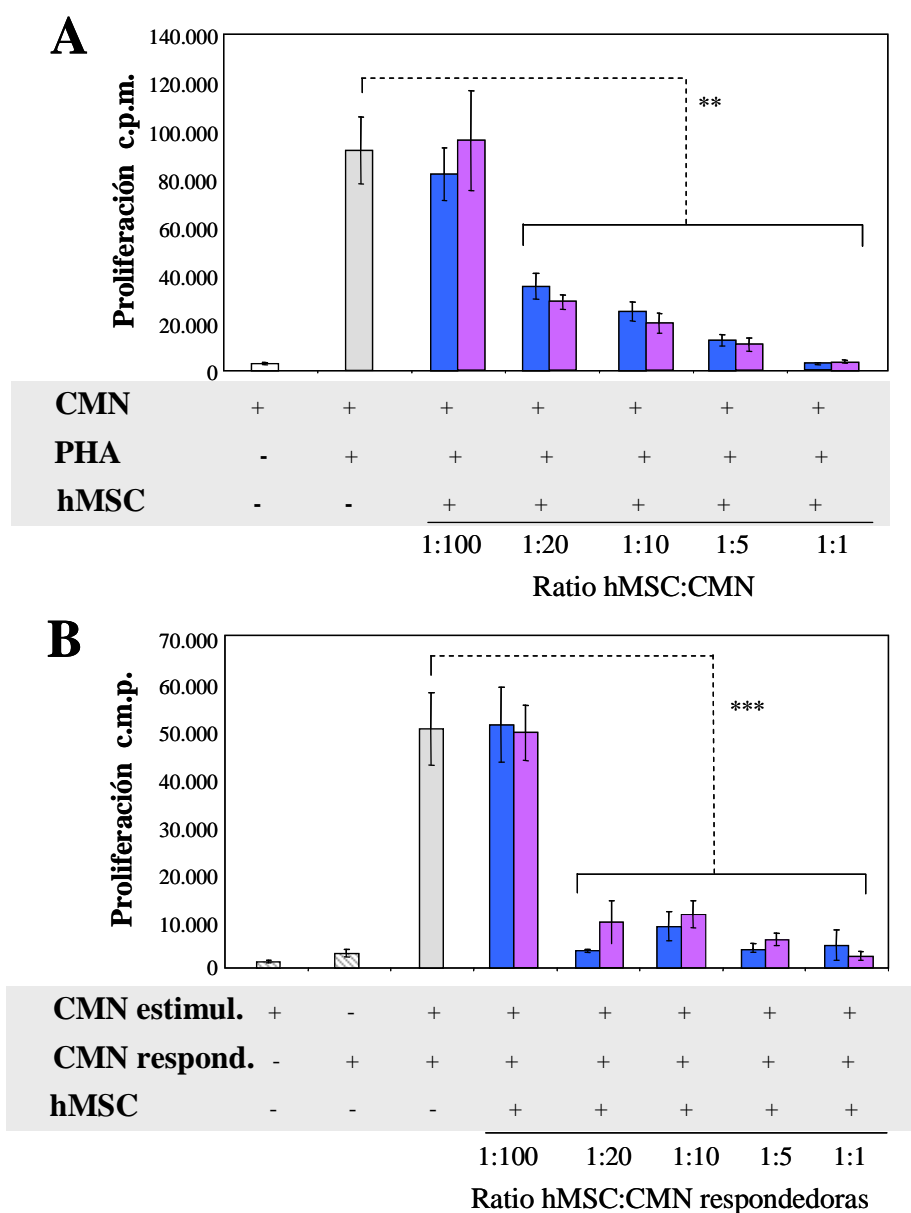


Figura 13: Efecto de las hMSC-Ad (barras azules) y las hMSC-MO (barras moradas) sobre la proliferación de los linfocitos T en respuesta (A) a estímulos mitogénicos y (B) a estímulos alogénicos. Abreviaturas: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; CMN estimul.: células mononucleadas estimuladoras; CMN respond.: células mononucleadas respondedoras; c.p.m.: cuentas por minuto.

2.1.2- PGE₂ es un factor soluble responsable del efecto inhibitor de las hMSC sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos T

Trabajos previos habían demostrado que las hMSC ejercen su acción inhibitoria sobre la proliferación de los linfocitos a través de factores solubles^{17, 30, 87}. Por esto, estudiamos la presencia de factores capaces de esta acción, como la prostaglandina E2 (PGE₂), que tiene un efecto directo en la proliferación y producción de citoquinas de los linfocitos T^{53,54}.

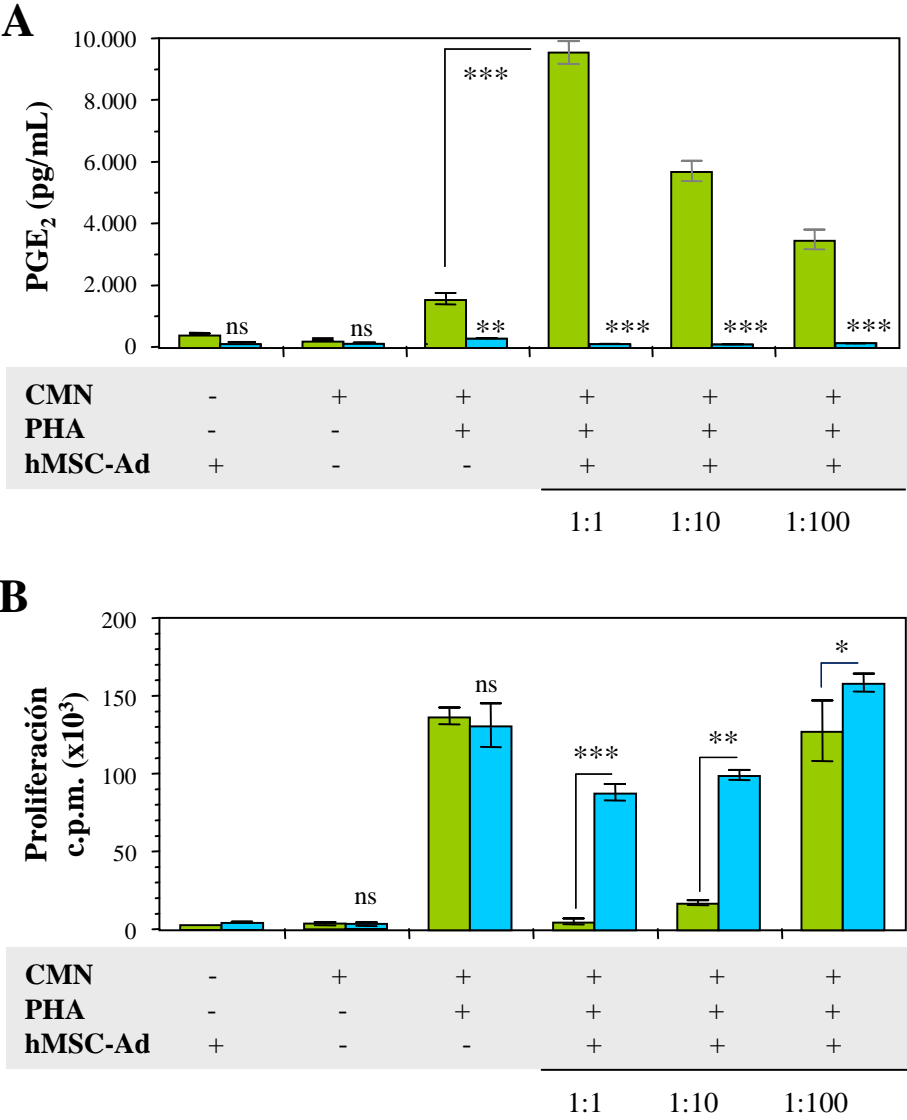
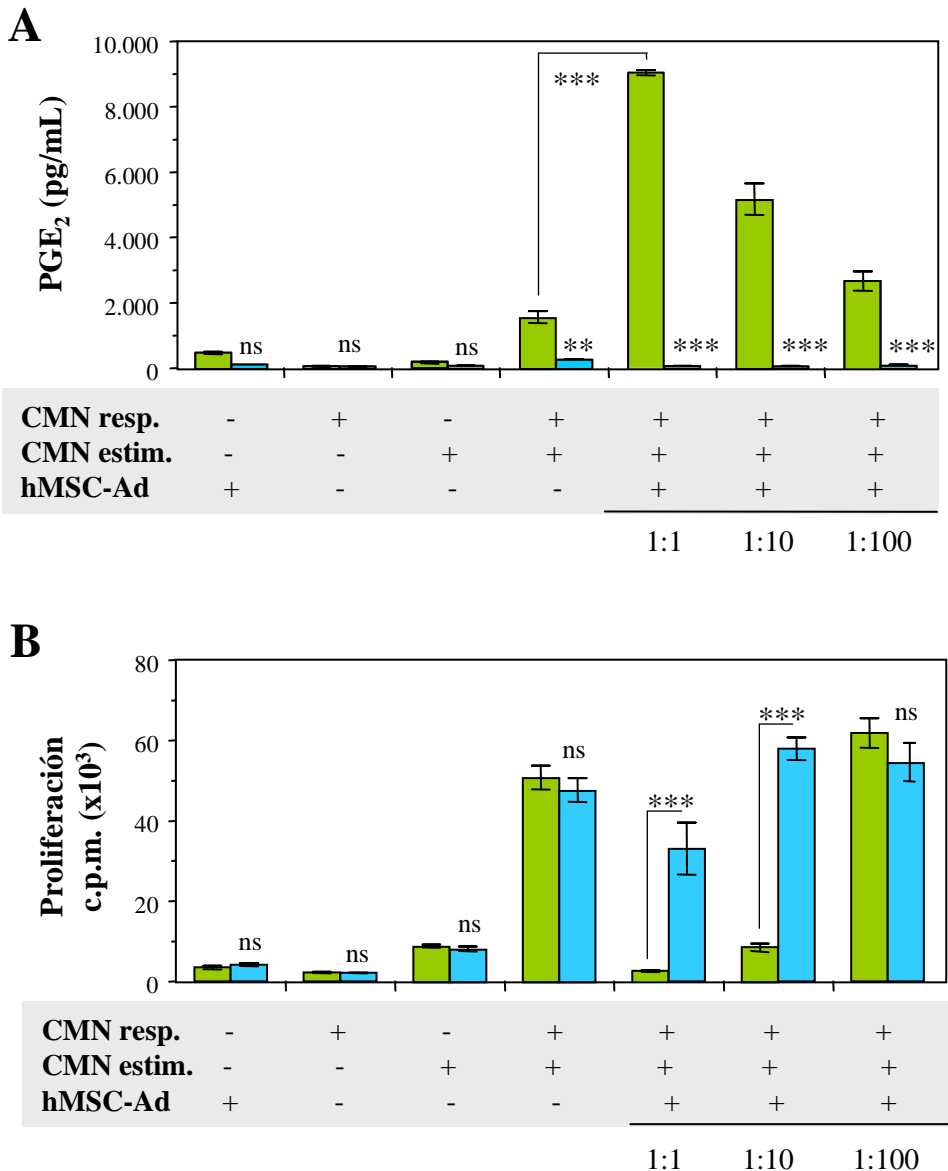


Figura 14: (A) Niveles de PGE₂ en co-cultivos de linfocitos T activados con PHA y hMSC-Ad en ausencia (barras verdes) o presencia (barras azules) de IDM. (B) Efecto de la PGE₂ y de su bloqueo con IDM (barras azules) sobre la proliferación de linfocitos T en co-cultivo con hMSC-Ad. Abreviaturas: CMN: células mononucleadas; ns: diferencia no significativa; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; c.p.m.: cuentas por minuto.

En nuestros experimentos, observamos que los niveles de PGE_2 detectados en los co-cultivos hMSC/linfocitos aumentaba significativamente (>2.700 pg/mL en todos los ratios de hMSC/CMN, **Figura 14A**, barras verdes) comparados con los niveles detectados en los cultivos de hMSC-Ad ($385,7 \pm 3,5$ pg/mL) o de linfocitos T activados con PHA (1.234 ± 6 pg/mL). Para comprobar si PGE_2 era el mediador responsable de la inhibición de la proliferación de los linfocitos T, bloqueamos su producción mediante indometacina (IDM), que inhibe la síntesis de PGE_2 . La IDM inhibió de manera significativa la producción de PGE_2 en los cultivos de linfocitos T activados con PHA (412 ± 2 pg/mL) o en co-cultivo con hMSC-Ad hasta niveles inferiores a 165 pg/mL en todos los ratios (**Figura 14A**, barras azules). La inhibición de la PGE_2 resultó en el mantenimiento de la proliferación de los linfocitos T respondedores (**Figura 14B**, barras azules), más evidente en los ratios de hMSC-Ad:CMN más elevados. Se observaron resultados similares cuando las hMSC fueron obtenidas de médula ósea.

Asimismo, comprobamos que los niveles de PGE_2 aumentaron significativamente en los cultivos mixtos de linfocitos en presencia de hMSC-Ad a niveles por encima de 2.700 pg/mL en todos los ratios, comparados con los niveles basales del cultivo mixto linfocitario y el cultivo de las hMSC-Ad (**Figura 15A**, barras verdes). La adición de IDM al co-cultivo inhibió significativamente la producción de PGE_2 por debajo de 165 pg/mL en todos los ratios (**Figura 15A**, barras azules), preservándose la respuesta proliferativa de los linfocitos T (**Figura 15B**, barras azules). Todos estos resultados fueron similares cuando los estudios se realizaron tanto con hMSC derivadas de tejido adiposo como de médula ósea.

En conjunto, estos resultados indican que PGE_2 es un factor soluble responsable de los efectos inmunosupresores de las hMSC sobre la inhibición de los linfocitos T estimulados con mitógenos o con estímulos alogénicos.



2.1.3- Las hMSC cambian el perfil de secreción de citoquinas de los linfocitos T activados

Para estudiar el efecto de las hMSC sobre el patrón de secreción de citoquinas de los linfocitos T activados, analizamos los sobrenadantes procedentes de los co-cultivos de linfocitos T activados con PHA/hMSC (**Figura 13A**). En la **Figura 16** (barras verdes) puede observarse que la adición de hMSC-Ad o hMSC-MO al cultivo de linfocitos T activados con PHA cambia el perfil pro-inflamatorio de secreción de citoquinas hacia uno anti-inflamatorio. Así, los valores de citoquinas pro-inflamatorias obtenidos en los cultivos de linfocitos T activados fueron: TNF- α 232 ± 7 pg/ml (**Figura 16A, barras verdes**), IFN- γ $401,5 \pm 4$ pg/ml (**16B**), IL-12 268 ± 5 pg/ml (**7C**), IL-6 2.470 ± 7 pg/ml (**16D**) e IL-5 136 ± 19 pg/ml (**16E**). En presencia de hMSC-Ad o hMSC-MO estos valores disminuyeron significativamente, encontrándose descensos de TNF- α hasta $38,5 \pm 15$ pg/ml y 67 ± 2 pg/ml (**Figura 16A, barras verdes**), IFN- γ hasta 47 ± 2 pg/ml y 46 ± 5 pg/ml (**16B**), IL-12 hasta $34,4 \pm 4$ pg/ml y 36 ± 2 pg/ml (**16C**), IL-6 hasta 87 ± 9 pg/ml y 125 ± 0.5 pg/ml (**16D**), e IL-5 hasta 39 ± 7 pg/ml y 37 ± 2 pg/ml (**16E**), respectivamente. El perfil anti-inflamatorio se evidenció por un incremento de los niveles de IL-10 desde $93,5 \pm 2$ pg/ml hasta 135 ± 35 pg/ml y 128 ± 21 pg/ml en presencia de hMSC-Ad o hMSC-MO, respectivamente (**Figura 16F, barras verdes**). Estos resultados confirman que las hMSC-Ad y hMSC-MO ejercen su efecto inmunosupresor inhibiendo la proliferación de los linfocitos T activados y cambiando el patrón de secreción de citoquinas hacia un perfil anti-inflamatorio.

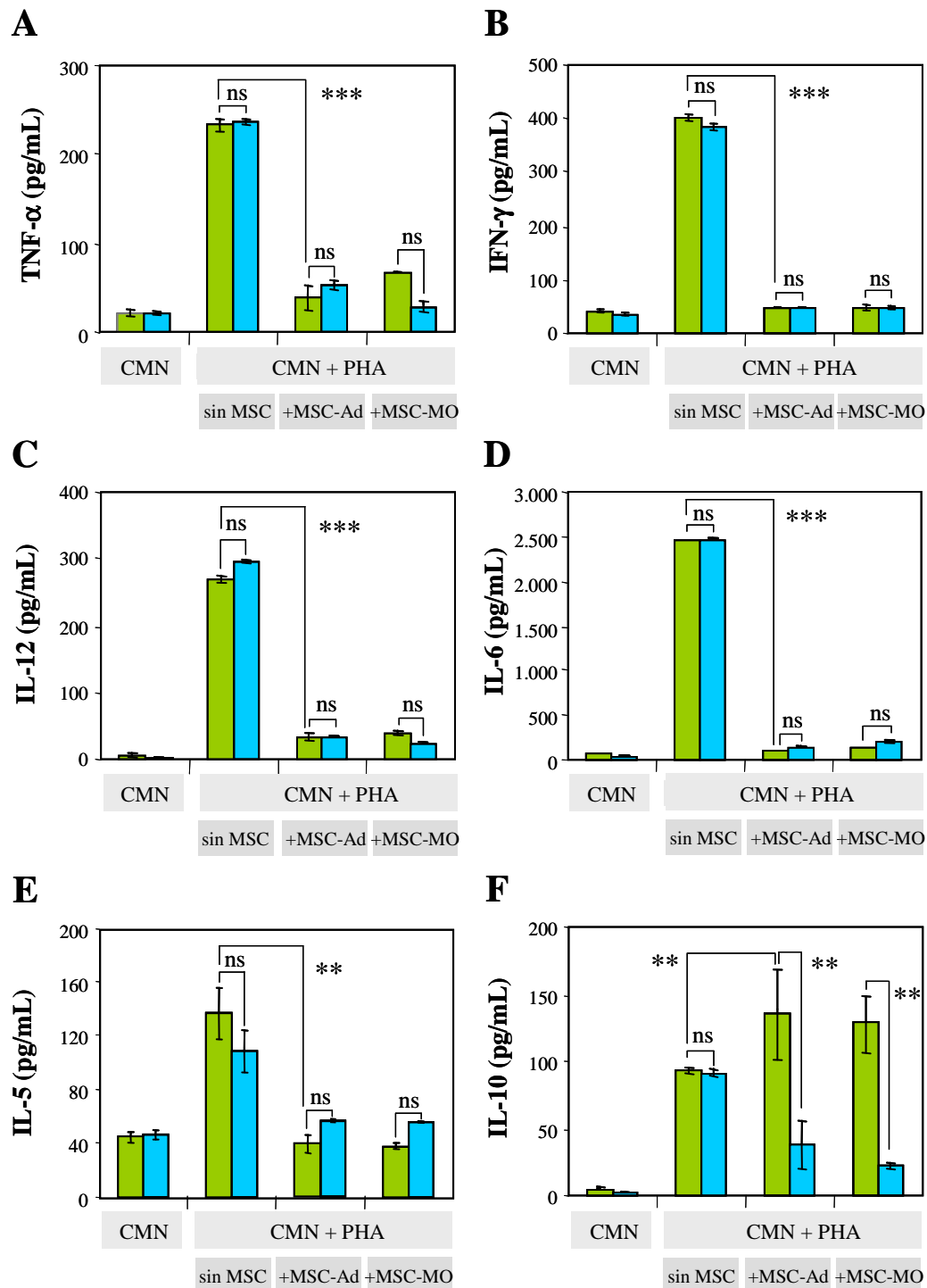


Figura 16: Perfil de secreción de citoquinas de los linfocitos T activados con PHA en ausencia y en presencia de hMSC-Ad o de hMSC-MO, sin IDM (barras verdes) o con IDM (barras azules). Abreviaturas: ns: diferencia no significativa, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

2.1.4- El bloqueo de PGE₂ inicialmente sólo restaura los niveles de IL-10 en los co-cultivos de MSC con linfocitos T activados con PHA

Considerando los resultados anteriores, donde identificamos PGE₂ como mediador en el efecto inhibitor de las hMSC sobre la proliferación de linfocitos T activados, estudiamos si la inhibición de PGE₂ mediante la adición de IDM también restauraba el perfil de secreción de citoquinas pro-inflamatorias. Para ello analizamos el nivel de citoquinas en los co-cultivos de linfocitos T activados con PHA, en presencia de hMSC-Ad o hMSC-MO, y tras la adición de IDM (**Figura 16**, barras azules). Sorprendentemente, el bloqueo de PGE₂ no restauró el perfil de citoquinas esperado en los linfocitos T activados a pesar de su estado proliferativo (**Figura 14B**). Esto muestra que, al menos durante el tiempo de estudio, los linfocitos T co-cultivados con hMSC después del bloqueo de PGE₂ con IDM son capaces de proliferar, pero esto no está acompañado necesariamente por la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias analizadas.

En contraste con los datos obtenidos con las citoquinas pro-inflamatorias, la adición de IDM disminuyó los niveles de IL-10 en los co-cultivos de linfocitos T activados con PHA junto con hMSC-Ad (38 ± 18 pg/ml vs. 135 ± 37 pg/ml, $p < 0,01$) o hMSC-MO (22 ± 3 pg/ml vs. 128 ± 21 pg/ml, $p < 0,01$) (**Figura 16F**, barras azules). Estos resultados demuestran que el bloqueo de PGE₂ tiene un efecto más evidente e inmediato en la producción de IL-10.

2.1.5- Las hMSC modifican la expresión de ARNm de los factores implicados en la diferenciación de Th1/Th2 de los linfocitos T activados

Para profundizar en el análisis de nuestros resultados, estudiamos la variación en la expresión génica de los factores implicados en la proliferación celular en los co-cultivos de linfocitos T activados/hMSC en presencia o ausencia de IDM. Como se puede observar en la **Figura 17**, la presencia de hMSC-Ad en los cultivos de linfocitos T activados con PHA, disminuyó considerablemente la expresión ARNm de los factores de proliferación CCNE1, PCNA, CDK2 y E2F1 en los linfocitos T. Esto está en concordancia con la inhibición de la proliferación de los linfocitos T detectada en estos cultivos (**Figura 14B**, barras verdes). La adición de IDM a estos co-cultivos resultó en el mantenimiento de la proliferación (**Figura 14B**, barras azules), acompañado con la

sobre expresión de estos factores comparados con valores del co-cultivo sin IDM. Los valores observados en los co-cultivos tras la adición de IDM fueron similares a los observados en los cultivos de linfocitos T activados con PHA.

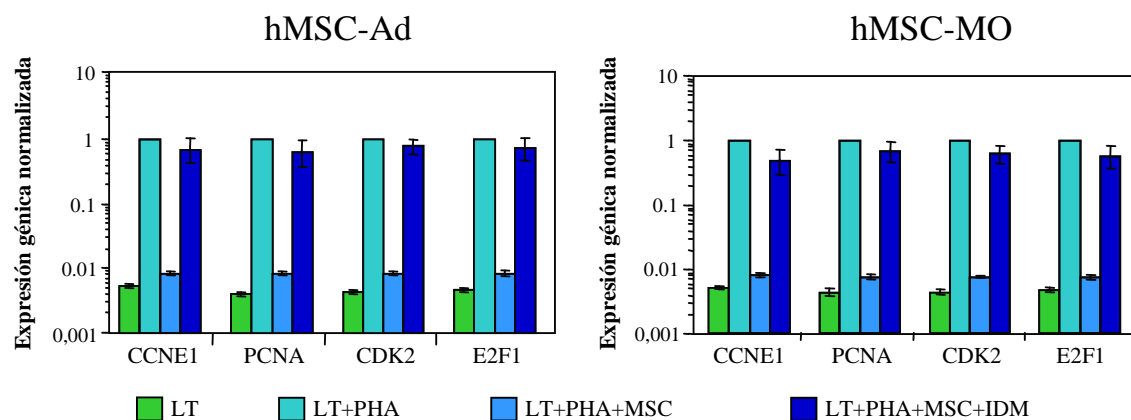


Figura 17: *Expresión génica de factores de transcripción implicados en proliferación en co-cultivos de hMSC-Ad/linfocitos T activados con PHA, en presencia o ausencia de IDM. Abreviaturas: LT: linfocitos T; IDM: indometacina.*

Sin embargo, hemos descrito que la adición de IDM no restaura el perfil de secreción de citoquinas pro-inflamatorias de linfocitos T activados en co-cultivo con hMSC (**Figura 16A-D**, barras azules). Para determinar qué población de linfocitos T activados estaba proliferando, estudiamos los niveles de ARNm de los factores de transcripción implicados en la polarización Th1/Th2/Th17.

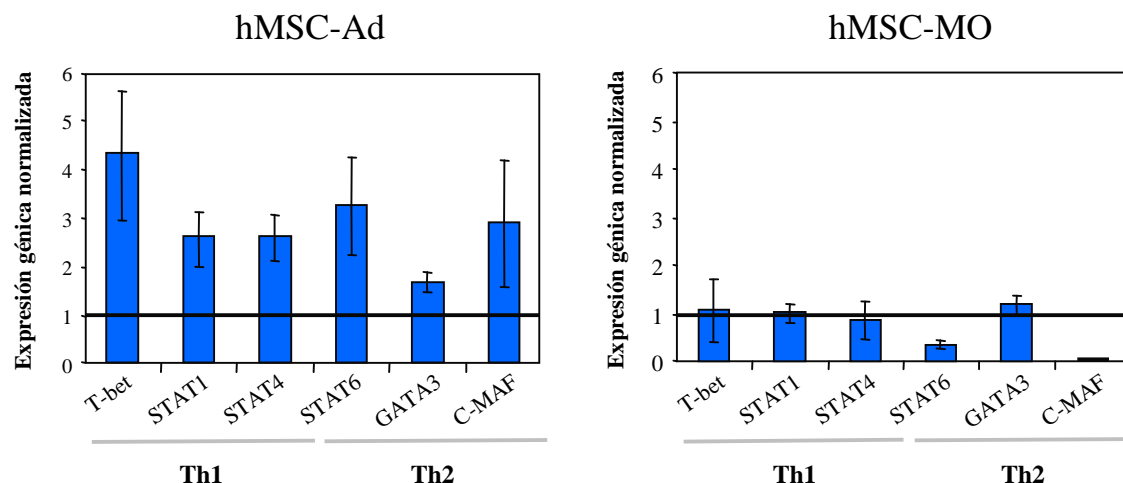


Figura 18: *Expresión génica de factores de transcripción implicados en la polarización Th1/Th2 en los co-cultivos de hMSC-Ad/linfocitos T activados con PHA, en presencia (barras azules) o ausencia (línea negra) de IDM.*

La adición de las hMSC-Ad a los linfocitos T activados con PHA disminuyó hasta niveles muy bajos la expresión del ARNm de los factores de transcripción implicados en la polarización Th1 (T-bet, STAT1 y STAT4), Th2 (STAT6, GATA3 y MAF) y Th17 (ROR γ T). La adición de IDM a estos co-cultivos produjo un aumento del ARNm de todos estos factores comparados con los cultivos control sin IDM (**Figura 18**, línea negra), excepto en el caso de ROR γ T que siempre permaneció indetectable. Por el contrario, en los co-cultivos de linfocitos T activados con hMSC-MO, la adición de IDM no varió la expresión de ARNm de estos factores comparada con la de co-cultivos sin IDM (**Figura 18**, línea negra).

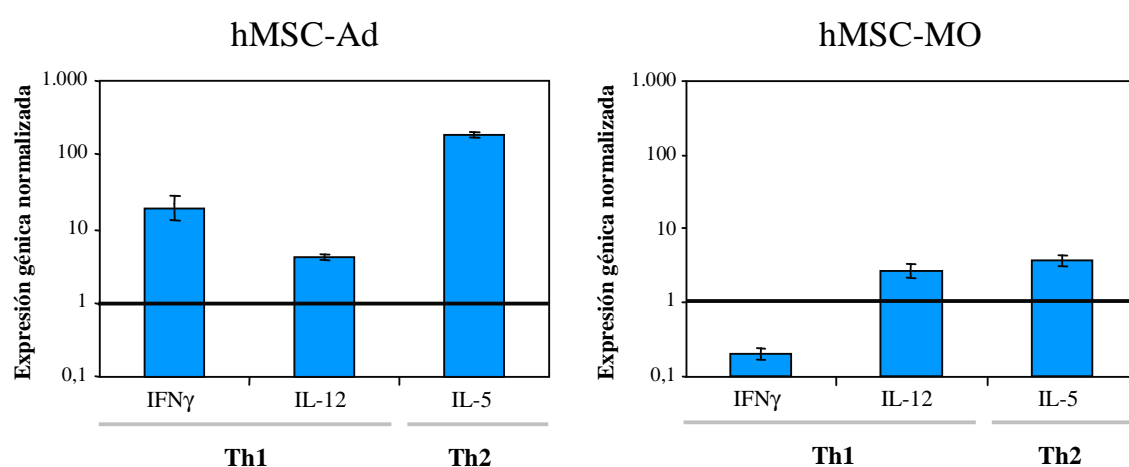


Figura 19: *Expresión génica de ARNm de IFN- γ , IL-12 e IL-5 en los co-cultivos de hMSC-Ad/linfocitos T activados con PHA, en presencia (barras azules) o ausencia (línea negra) de IDM.*

Para valorar si el aumento de factores de transcripción relacionados con la polarización Th1/Th2 se acompañaba de un aumento de los ARNm de citoquinas representativas de las dos subpoblaciones de linfocitos Th, estudiamos los niveles de expresión de ARNm de IFN- γ , IL-12 e IL-5. Así, detectamos que la adición de IDM a los co-cultivos de hMSC-Ad/linfocitos T activados con PHA producía un incremento en la expresión de ARNm de IFN- γ e IL-12 (vía Th1), así como IL-5 (vía Th2), comparada con cultivos sin IDM (**Figura 19**, línea negra). Por otra parte, tras la adición de IDM al co-cultivo de hMSC-MO/linfocitos T activados con PHA, sólo se observó un ligero incremento en la expresión de ARNm de IL-12 e IL-5, y un descenso en la expresión de ARNm de IFN- γ . Los resultados obtenidos muestran diferencias en los niveles de expresión de ARNm

de factores de transcripción y citoquinas analizados cuando se valoraron co-cultivos con hMSC-Ad o hMSC-MO. Estas diferencias podrían ser debidas al momento de análisis, ya que el desarrollo del efecto producido por ambos tipos de hMSC podría darse en distintos tiempos.

2.2- Las hMSC tienen efectos inmunosupresores sobre las células dendríticas mieloides y células dendríticas plasmocitoides

Las células dendríticas constituyen una población del sistema inmune responsable de la captación, procesamiento y presentación antigénica a los linfocitos T. Esta población tiene un papel importante en el EICH. Nuestro siguiente objetivo fue estudiar el impacto de las propiedades inmunosupresoras de las hMSC sobre las células dendríticas.

2.2.1- Las hMSC impiden la maduración de las CD-m y CD-p

Se generaron CD-m y CD-p inmaduras a partir de monocitos de sangre periférica, CD14⁺, de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos. Al cabo de 7 días en cultivo, las CD-m inmaduras carecían de expresión del marcador de superficie CD14 y expresaban CD1a. Tras la adición de LPS al cultivo de CD inmaduras para inducir su maduración, se verificó por citometría de flujo que el 95% de las células expresaban CD86 (98,1%), CD80 (92%), HLA-DR (99,8%) y CD83 (99,2%) (**Figura 20**), marcadores de superficie específicos de CD-m maduras. Cuando se estudiaron las CD-p, se observaron resultados similares.

Para evaluar el impacto de las hMSC sobre la maduración de las CD, se co-cultivaron CD-m o CD-p inmaduras, generadas durante 7 días, junto con hMSC-Ad durante 48 horas adicionales, tras las que se añadió LPS para inducir la maduración de las CD. Como puede observarse en la **Figura 20**, en comparación con los datos obtenidos en los cultivos de CD-m maduras en ausencia de hMSC, los marcadores de expresión de superficie de las CD (CD80, CD86, HLA-DR, y CD83) asociados a maduración se expresaban de una forma significativamente disminuida. Resultados similares se detectaron con respecto a las CD-p.

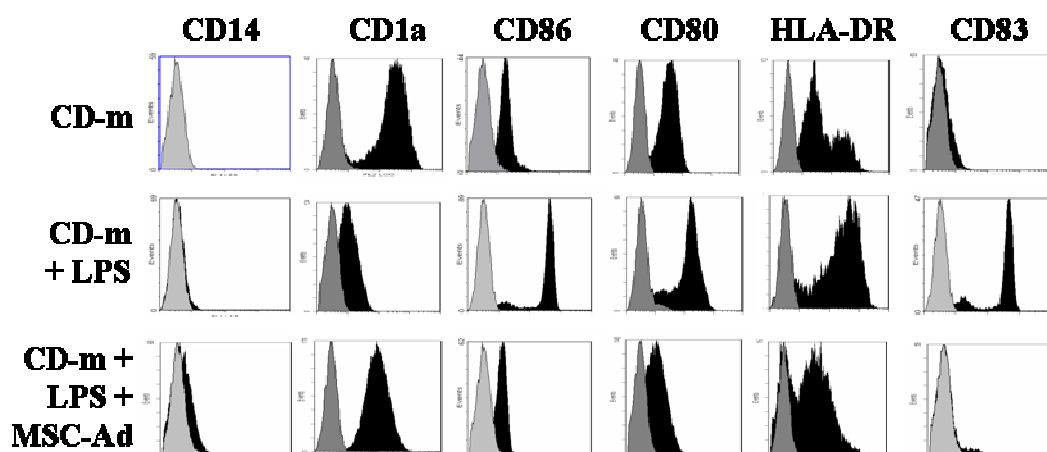


Figura 20: Análisis por citometría de flujo del inmunofenotipo de células dendríticas mieloides maduras con LPS en presencia o ausencia de hMSC-Ad.

Para confirmar el efecto de las hMSC sobre la maduración de las CD, estudiamos el perfil de citoquinas secretado por CD cultivadas en presencia o ausencia de hMSC. En primer lugar, detectamos que la adición de LPS para inducir la maduración de ambos tipos de CD aumentó de forma significativa los niveles de TNF- α (1.637 ± 25 pg/mL), IL-12 (3.417 ± 65 pg/mL) e IFN- γ (532 ± 53 pg/mL) secretados por las CD-m maduras (**Figura 21A**), y de IL-10 (216 ± 44 pg/mL) secretado por las CD-p maduras (**Figura 21B**), comparado con los valores del cultivo de CD-m inmaduras (TNF- α : $42,4 \pm 1$ pg/mL; IL-12: $100,5 \pm 6$ pg/mL; IFN- γ : $36 \pm 0,05$ pg/mL), y de CD-p inmaduras (IL-10: $22 \pm 1,5$ pg/mL), respectivamente. Para valorar el efecto de las hMSC sobre la maduración, se co-cultivaron CD-m y CD-p inmaduras junto con hMSC-Ad o hMSC-MO durante 48h, tras las que se añadió LPS para inducir la maduración. El co-cultivo de CD-m con hMSC-Ad o hMSC-MO resultó en una disminución de la secreción de TNF- α ($969,9 \pm 0,2$ pg/mL y $582,3 \pm 181,2$ pg/mL, respectivamente), IFN- γ ($323,9 \pm 7,8$ pg/mL y $178,8 \pm 96,7$ pg/mL) e IL-12 ($852,3 \pm 12,5$ pg/mL y $1.960 \pm 107,7$ pg/mL), comparada con la secretada por las CD-m maduras de los cultivos sin hMSC (**Figura 21A**). En los co-cultivos de CD-p con hMSC-Ad o hMSC-MO los niveles de IL-10 aumentaron a $644 \pm 0,2$ pg/mL y $361,9 \pm 7$ pg/mL, respectivamente, comparados con los niveles detectados en los cultivos de CD-p maduras (216 ± 44 pg/mL) (**Figura 21B**).

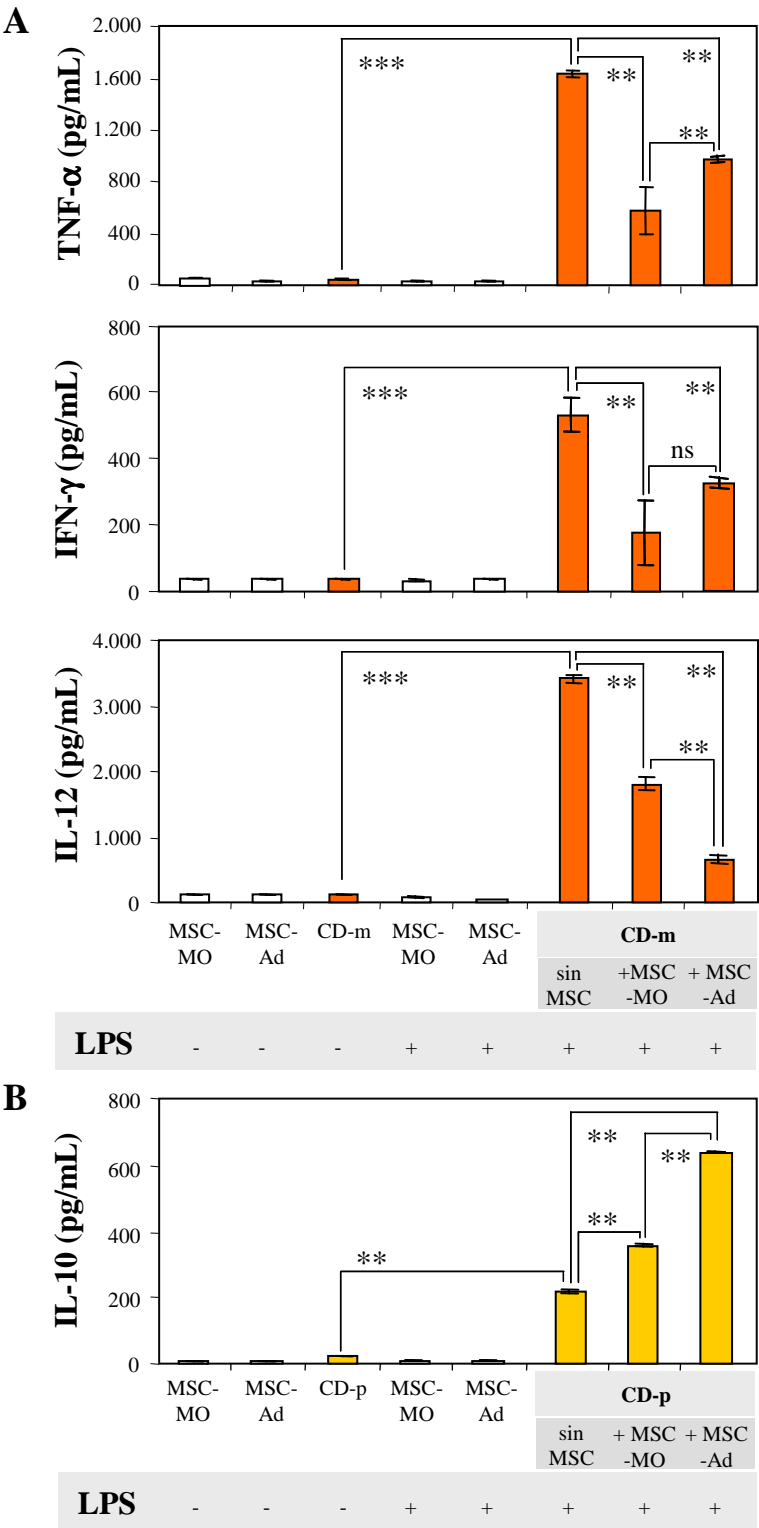


Figura 21: (A) Producción de TNF- α , IFN- γ e IL-12 por las CD-m; y de (B) IL-10 por las CD-p en presencia o ausencia de hMSC-MO y de hMSC-Ad. Abreviaturas: ns: diferencia no significativa; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Estos resultados muestran que las hMSC-Ad y hMSC-MO inhiben la maduración de las CD-m y CD-p demostrado por el inmunofenotipo inmaduro de las CD y por el perfil de secreción de citoquinas, a pesar de que los efectos relativos mediados por las hMSC de diferente origen varían según la citoquinas estudiadas.

2.2.2- PGE₂ es el factor soluble que media en el efecto de las hMSC sobre la maduración de las CD-p

Para profundizar en los posibles mecanismos implicados en el efecto de las hMSC sobre la maduración de las CD, estudiamos, en primer lugar, si el contacto entre hMSC y CD era necesario o si el efecto se ejercía a través de factores solubles. Así, en co-cultivos hMSC-Ad/CD-m realizados en un sistema *transwell* que impide el contacto entre ambos tipos celulares, los niveles de citoquinas indicadoras de maduración fueron bajos, alcanzándose niveles de TNF- α ($58 \pm 0,5$ pg/mL), IFN- γ (188 ± 19 pg/mL) e IL-12 (730 ± 50 pg/mL) significativamente menores a los detectados en los cultivos de CD-m maduras (**Figura 21A**). Se obtuvieron resultados similares cuando se utilizaron hMSC-MO. Estos resultados señalan la implicación de un factor soluble en los efectos de las hMSC sobre las CD.

Hemos descrito que PGE₂ es un factor soluble que media en el efecto inmunosupresor de las hMSC sobre los linfocitos T. Para valorar su implicación como posible factor soluble responsable del efecto de las hMSC sobre la maduración de las CD, determinamos los niveles de PGE₂ en los co-cultivos de hMSC-Ad o hMSC-MO con CD-m y CD-p inmaduras, a los que se agregó LPS para inducir su maduración. Como puede observarse en la **Figura 22A**, se detectaron niveles muy bajos de PGE₂ en los cultivos de CD-m con o sin LPS (todas por debajo de 8 pg/mL). Los niveles de PGE₂ fueron elevados en los cultivos de hMSC-Ad (450 ± 5 pg/mL) o hMSC-MO (515 ± 11 pg/mL), y aumentaron de forma significativa tras la adición de LPS, hasta alcanzar $988,6 \pm 10,5$ pg/mL y $975,3 \pm 14,4$ pg/mL, respectivamente. Estos niveles fueron similares a los encontrados en los co-cultivos de hMSC-Ad y hMSC-MO con CD-m, en los que se detectaron 995 ± 18 pg/mL y 1.002 ± 9 pg/mL, respectivamente.

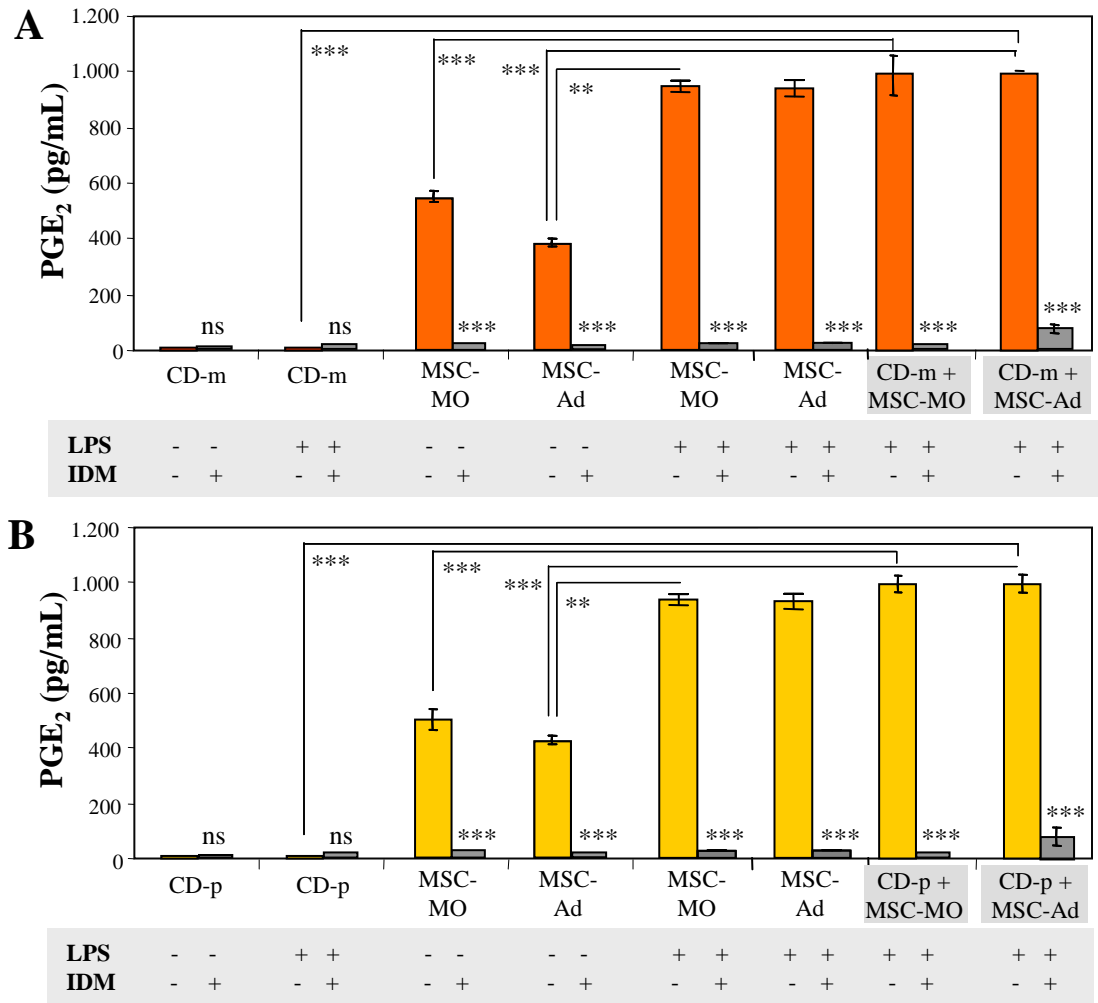


Figura 22: Niveles de PGE_2 en co-cultivos de (A) CD-m y de (B) CD-p maduras con LPS en presencia de hMSC-Ad, con o sin IDM (barras grises). Abreviaturas: ns: diferencia no significativa; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Para confirmar que PGE_2 era el mediador de estos efectos, se inhibió la síntesis de PGE_2 mediante la adición de IDM a los diferentes cultivos. En presencia de IDM, los niveles de PGE_2 disminuyeron de forma muy significativa en todos los cultivos, hasta valores inferiores a 20 pg/ml ($p < 0,001$) (**Figura 22 A**). Como se observa en la **Figura 22 B**, se obtuvieron resultados similares en los niveles de PGE_2 detectados cuando se estudiaron CD-p en los diferentes cultivos.

Con el objeto de confirmar que la PGE_2 secretada por hMSC-Ad y hMSC-MO era responsable de la inhibición de la maduración de CD-m y CD-p, analizamos la producción de citoquinas producidas por CD-m y CD-p en presencia de LPS en co-

cultivos con hMSC-Ad o hMSC-MO, después del bloqueo de PGE₂ con IDM. Como se puede observar en la **Figura 23A**, y en concordancia con lo mostrado en la **Figura 21A**, la adición de hMSC-Ad o hMSC-MO a los cultivos de CD-m disminuyó los niveles de TNF- α ($58,8 \pm 0,6$ pg/mL y $50,2 \pm 0,3$ pg/mL, respectivamente); IFN- γ ($106,6 \pm 0,4$ pg /mL y $98,9 \pm 4,2$ pg/mL) e IL-12 (1.299 ± 1 pg/mL y $1.454 \pm 0,8$ pg/mL) de forma significativa comparados con los de CD-m maduras con LPS sin hMSC ($604,4 \pm 1$ pg/mL; 512 ± 3 pg/mL; y 2.613 ± 11 pg/mL, respectivamente).

Sin embargo, de forma sorprendente, la adición de IDM al co-cultivo de hMSC con CD no reestableció los niveles de citoquinas detectados en los cultivos de CD-m maduras, que se mantuvieron en niveles similares a los de los cultivos de CD-m inmaduras (**Figura 23A**). Por lo tanto, el bloqueo de la secreción de PGE₂ no impidió los efectos inhibidores de las hMSC-Ad y hMSC-MO sobre la maduración de las CD-m demostrando que, a pesar de estar presente en valores elevados en los co-cultivos, PGE₂ no tiene un papel comprobado en nuestros ensayos como mediador en las propiedades inmunosupresoras de las hMSC sobre la maduración de las CD-m.

Por otra parte, los estudios realizados con CD-p, mostraron niveles elevados de IL-10 producidos en los co-cultivos con hMSC-Ad o hMSC-MO (272 ± 1 pg/mL y 429 ± 1 pg/mL respectivamente) (**Figura 23B**). La adición de IDM, produjo una disminución significativa de estos niveles ($111,3$ pg/mL y 109 ± 1 pg/mL, respectivamente), hasta valores semejantes a los obtenidos en CD-p maduras ($84,6 \pm 3$ pg/mL). Estos resultados demuestran que la PGE₂ secretada por las hMSC, al contrario que en el caso de las CD-m, sí tiene un papel esencial en el mantenimiento del estado inmaduro de las CD-p.

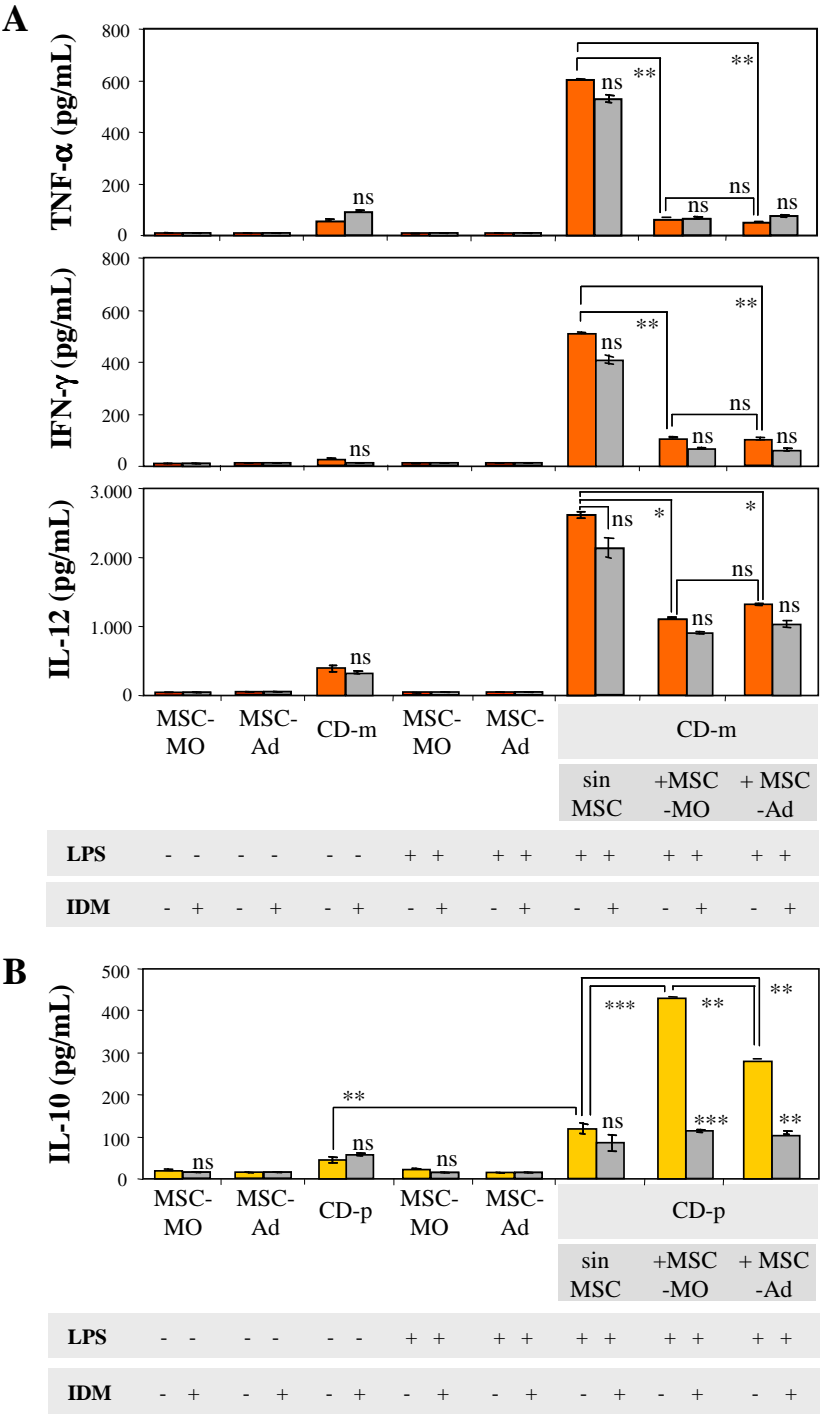


Figura 23: Niveles de (A) *TNF- α* , *IFN- γ* e *IL-12* en cultivos de *CD-m* y de (B) *IL-10* en cultivos de *CD-p* maduras con *LPS*, en presencia o ausencia de *hMSC* valorados antes y después de la adición de *IDM*. Abreviaturas: *LPS*: lipopolisacáridos; *IDM*: indometacina; *ns*: diferencia no significativa; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

2.2.3- El efecto de las hMSC sobre la maduración de las CD impide una correcta estimulación de los linfocitos T

Hemos realizado ensayos de proliferación de linfocitos T en co-cultivo con CD-m para estudiar si la falta de maduración de las CD-m provocada por las hMSC también afecta a su capacidad de estimular la respuesta de los linfocitos T. Para ello, se obtuvieron CD-m inmaduras, que se co-cultivaron en presencia de hMSC-Ad o hMSC-MO antes de la adición de LPS (D9) o simultáneamente a la adición de LPS (D7). Esta variación se realizó para estudiar si el co-cultivo hMSC/CD durante 48h antes de la adición de LPS condicionaba las CD antes de la inducción de la maduración -y por lo tanto el efecto inhibitor se ejercía sobre el final de la diferenciación- más que sobre la inducción de la maduración. Los resultados obtenidos muestran que tanto las CD-m D7 como CD-m D9, co-cultivadas con hMSC-Ad o hMSC-MO, tienen una menor capacidad de inducir la proliferación de los linfocitos T en comparación con las CD-m cultivadas sin hMSC (Figura 24).

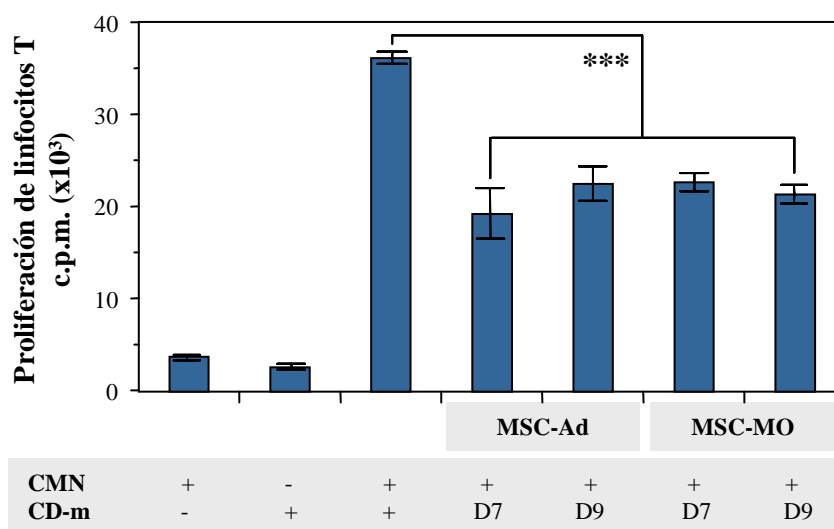


Figura 24: Respuesta proliferativa de linfocitos T en presencia de CD-m co-cultivadas con hMSC-Ad o hMSC-MO dos días antes (D7) o simultáneamente (D9) a la adición de LPS para inducir la maduración de las CD. Abreviaturas: *** <0,001; c.p.m.: cuentas por minuto.

3- LAS MSC OBTENIDAS DE TEJIDO ADIPOSO DE RATÓN TIENEN CARACTERÍSTICAS SIMILARES A LAS MSC-AD HUMANAS

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar el impacto de las propiedades inmunosupresoras de las MSC sobre el efecto injerto contra leucemia (ICL). En un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos el efecto ICL tiene un papel fundamental en la erradicación de la enfermedad maligna residual. Para ello, fue necesario desarrollar un modelo de ratón con leucemia residual tras un trasplante haploidéntico y evaluar el impacto de la infusión de MSC para prevenir el EICH sobre la recidiva de la leucemia.

3.1- Expansión y caracterización de las mMSC-Ad

En primer lugar se obtuvieron y expandieron mMSC provenientes de tejido adiposo de ratones B6D2F1, según lo descrito en el apartado Materiales y Métodos. En los distintos experimentos *in vivo* realizados, se utilizaron mMSC entre los pases 5-9. Las mMSC-Ad crecieron en adherencia presentando el aspecto fibroblastoide característico (**Figura 25A**).

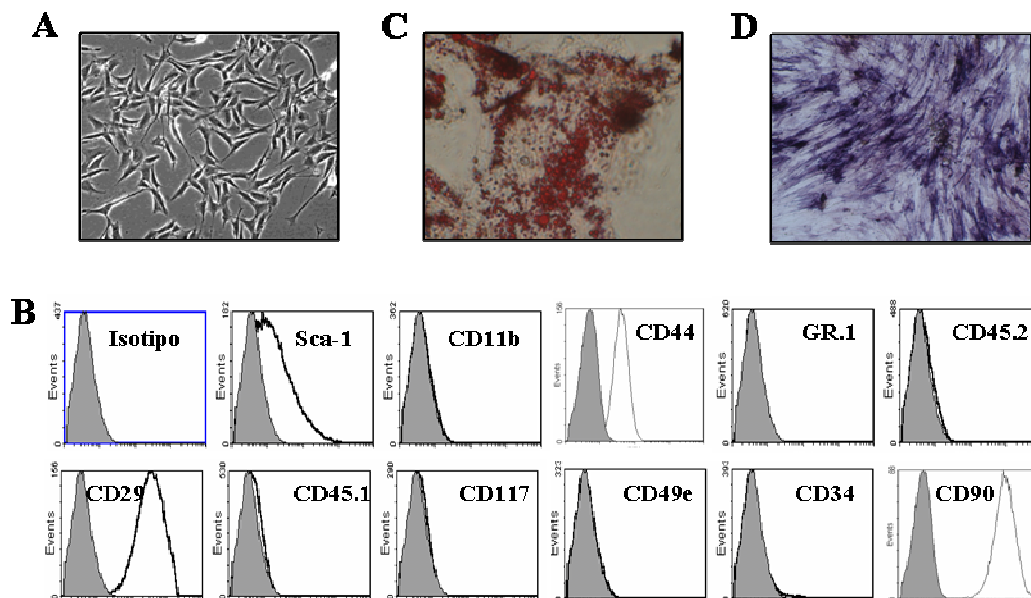


Figura 25: (A) Cultivo de mMSC-Ad en adherencia mostrando la morfología característica fibroblastoide de las mMSC-Ad (B) e inmunofenotipo representativo de las mMSC-Ad. Diferenciación (C) adipogénica y (D) osteogénica de la mMSC-Ad.

De manera similar a las hMSC, las mMSC-Ad tampoco poseen un marcador de superficie específico y su caracterización inmunofenotípica se define mediante un panel de marcadores de superficie. El análisis de inmunofenotipo obtenido fue el característico de las mMSC, siendo negativas para marcadores hematopoyéticos CD34, CD45, CD11b y CD117 y positivas para Sca-1, CD90.2, CD29, CD73 y CD105. En la **Figura 25B** se muestran los histogramas de los marcadores de superficie más significativos.

3.2- Diferenciación a tejido óseo y tejido adiposo de las mMSC-Ad

Del mismo modo que se analizó la capacidad de diferenciación de las hMSC, también se comprobó la capacidad de diferenciación hacia tejido óseo y adiposo de las mMSC-Ad. La capacidad de diferenciación adipogénica y osteogénica de las mMSC-Ad se realizó según lo descrito en el apartado Materiales y Métodos. Así, se comprobó su capacidad de diferenciación adipogénica mediante la presencia de gotas lipídicas teñidas con Oil Red O (**Figura 25C**) y su capacidad de diferenciación osteogénica mediante la detección de la actividad de la fosfatasa alcalina utilizando Fast BCIP/NBT (**Figura 25D**).

3.3- Las mMSC-Ad tienen efectos inmunosupresores sobre la respuesta inmune de los linfocitos T

Para comprobar que las mMSC-Ad tienen propiedades inmunosupresoras sobre la capacidad de proliferación de los linfocitos T estimulados con mitógenos, analizamos el efecto de las mMSC-Ad de ratones B6D2F1 ($H2^{b/d}$) sobre la proliferación de linfocitos T procedentes de ratones B6D2F1 ($H2^{b/d}$) (contexto singénico) o C57Bl/6 ($H2^{b/b}$) (contexto alogénico), estimulados con Concanavalina A (ConA).

En la **Figura 26** se observa que las mMSC-Ad poseen una capacidad de inmunosupresión significativa ($p < 0,0001$) sobre la proliferación de los linfocitos T tanto en un contexto (A) singénico como en uno (B) alogénico de una manera dosis dependiente.

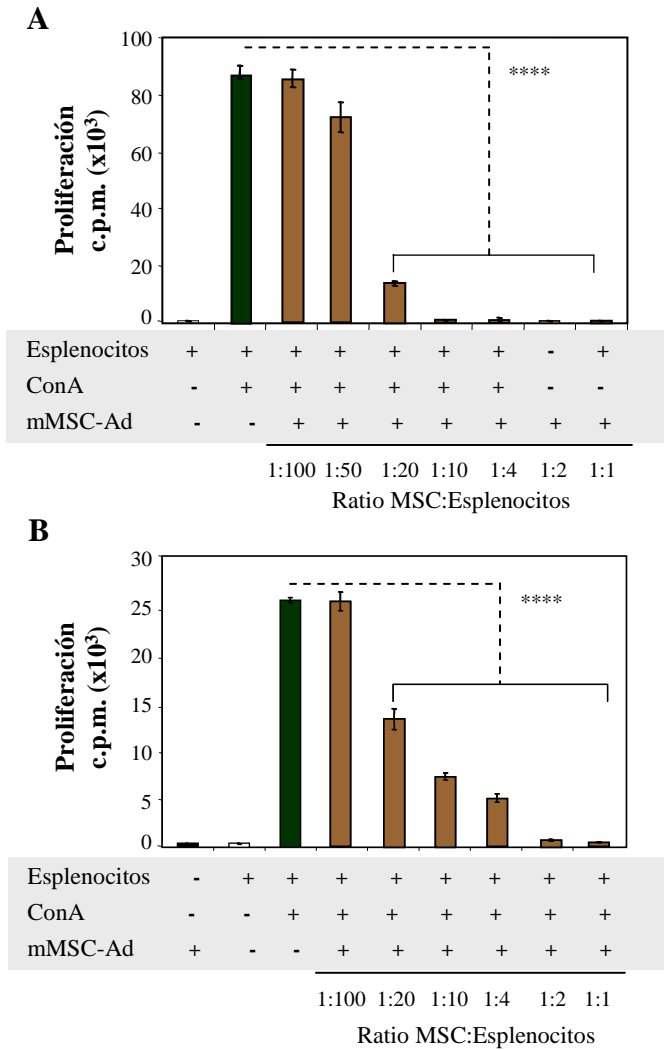


Figura 26: Efecto de las mMSC-Ad (barras marrones) sobre la proliferación de los linfocitos T en respuesta a estímulos mitogénicos (A) en un contexto singénico y (B) en un contexto alogénico. Abreviaturas: **** $p < 0,0001$. ConA: concanavalina A.

4- LA ADMINISTRACIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS *BCR/ABL*⁺ EN UN TRASPLANTE HAPLOIDÉNTICO EN RATÓN GENERA UN CUADRO SIMILAR A UNA RECAÍDA DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

La leucemia mieloide crónica (LMC) es la patología que responde mejor a la infusión de linfocitos T⁶⁸, que basa su eficacia en el efecto injerto contra leucemia (ICL). Para estudiar el efecto de las propiedades inmunosupresoras de las MSC sobre el efecto ICL,

fue necesario desarrollar modelos de ratón de LMC, de recaída de LMC, de enfermedad injerto contra huésped (EICH) además del modelo de ratón de efecto ICL. Asimismo, se generaron modelos de ratón de trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) y de irradiación como grupos control. Todos estos grupos fueron generados y analizados en cada uno de los seis experimentos realizados.

4.1- Generación de progenitores hematopoyéticos leucémicos mediante transducción retroviral

Para generar progenitores hematopoyéticos leucémicos y poder desarrollar un modelo de ratón con un cuadro similar a una LMC, se transdujo la fracción Lin^- de la médula ósea de ratones B6D2F1 ($\text{H2}^{\text{b/d}}$), enriquecida en progenitores hematopoyéticos, con el vector retroviral MSCVp210-ires-NGFR que expresa el oncogén humano *BCR/ABL* y el gen marcador *NGFR* truncado. El día de la infusión de estas células, el análisis por citometría de flujo mostró un porcentaje de células $\text{Lin}^- \text{NGFR}^+$ de $6,5 \pm 0,5\%$. Este porcentaje aumentó hasta el $48,6 \pm 4,3\%$ en alícuotas cultivadas durante 72 horas adicionales.

Para analizar si la infusión de estos progenitores hematopoyéticos transducidos generaban un cuadro similar a una LMC, se infundió una dosis fija de 10^5 células NGFR^+ a un total de 28 receptores singénicos B6D2F1 ($\text{H2}^{\text{b/d}}$) letalmente irradiados de seis experimentos independientes (**Figura 27**).

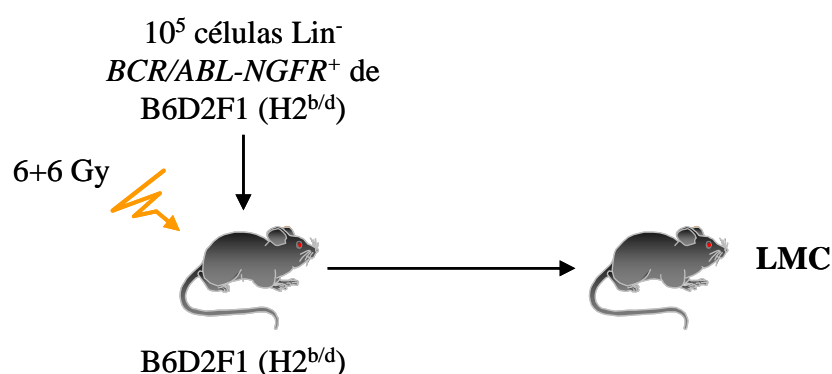


Figura 27: Esquema indicativo del desarrollo de un modelo de ratón con un síndrome mieloproliferativo similar a una LMC.

La infusión de estos progenitores produjo un síndrome mieloproliferativo similar a una leucemia, caracterizada por una leucocitosis que alcanzó los $35 \pm 6 \times 10^9/\text{L}$ leucocitos en el día de la muerte, con una granulocitosis de $25 \pm 5 \times 10^9/\text{L}$. El análisis por citometría de flujo en sangre periférica detectó $8 \pm 1\%$ de células expresando NGFR, la mayoría granulocitos y metamielocitos. Entre los días 17-28 tras el trasplante (media: 18 días) (**Figura 20**), los ratones morían o tenían que ser sacrificados debido al deterioro en su estado clínico, caracterizado por pelaje alterado, movilidad reducida y encorvamiento. En las necropsias se observaron médulas óseas hipercelulares, con un $70 \pm 2\%$ de células NGFR⁺ según los análisis por citometría de flujo. El análisis semanal realizado mediante citometría de flujo de la sangre periférica y la MO de los ratones en el día de la muerte, mostró un injerto completo de células singénicas CD45.2. Los ratones presentaban una marcada esplenomegalia (**Figura 28A**), hepatomegalia (**Figura 28B**) y pulmones hemorrágicos (**Figura 28C**) con evidentes infiltraciones leucémicas. A pesar de las variaciones en las eficacias de transducción, la latencia del desarrollo de la enfermedad y el cuadro clínico fue similar en todos los ratones de todos los experimentos.

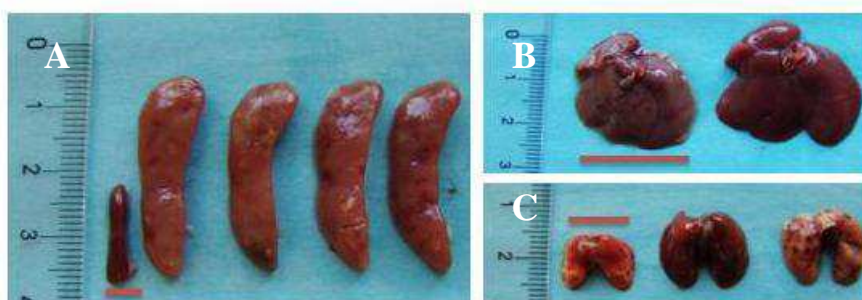


Figura 28: Órganos representativos de los ratones pertenecientes al grupo LMC donde se observa (A) una marcada esplenomegalia, (B) hepatomegalia y (C) pulmones hemorrágicos con infiltraciones leucémicas, comparados con los órganos con los ratones control (línea roja).

4.2- Desarrollo de un modelo de ratón de recaída de LMC

Con el objetivo de reproducir un cuadro similar al de una recidiva leucémica (rLMC) producida por células malignas residuales que pudieran haber sobrevivido a la irradiación, se infundieron, la misma dosis de 10^5 células Lin⁻ singénicas NGFR⁺ junto

con 10^7 células haploidénticas de MO de donantes C57Bl/6 ($H2^{b/b}$) en 31 receptores B6D2F1 ($H2^{b/d}$) letalmente irradiados (**Figura 29**).

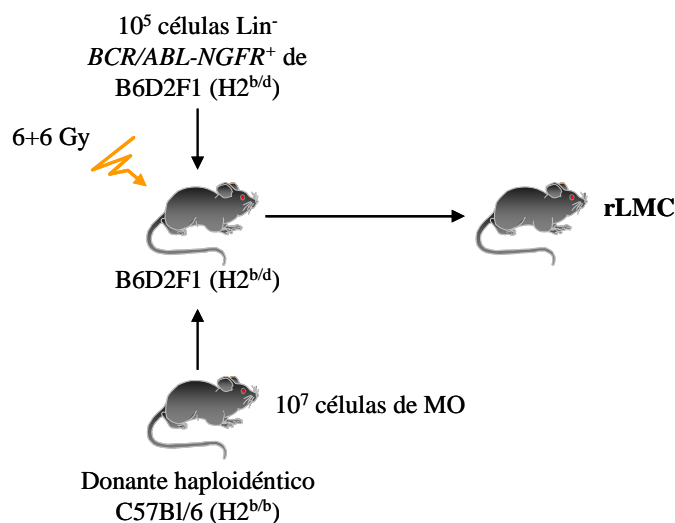


Figura 29: Esquema indicativo del desarrollo de un modelo de ratón con un síndrome mieloproliferativo similar a una recidiva de LMC.

Todos los ratones excepto 1 (30/31), desarrollaron características clínicas de un síndrome mieloproliferativo similar a una recaída de LMC, produciéndose su muerte entre los días 28-60 después del cotrasplante (**Figura 30**).

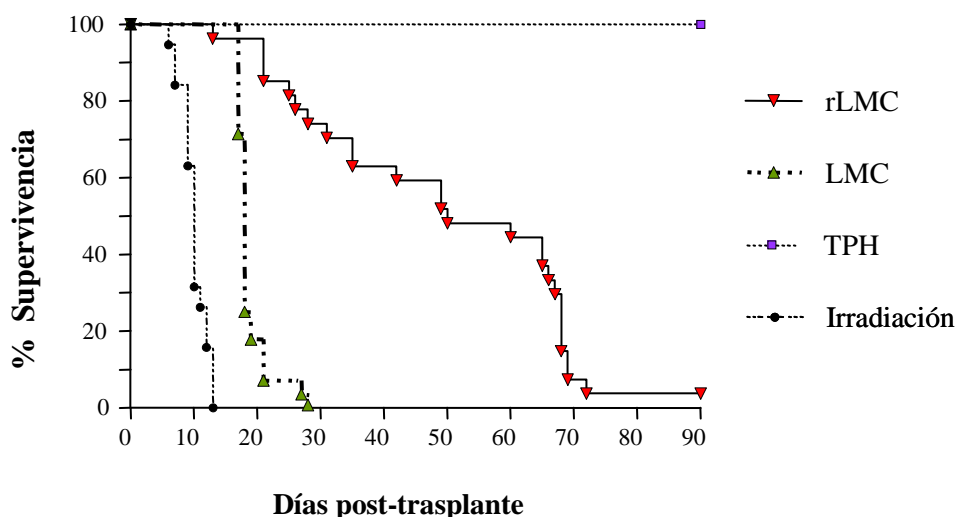


Figura 30: Supervivencia de los ratones pertenecientes a los grupos LMC y recaída de LMC (rLMC) comparados con los grupos control de irradiación y de TPH.

Los signos clínicos de estos ratones fueron similares a los de los ratones del grupo LMC, mostrando un pelaje alterado, movilidad reducida y encorvamiento. El análisis semanal de la sangre periférica de los ratones mostró un porcentaje aumentado de granulocitos (**Figura 31A**) en comparación con los ratones del grupo control de TPH (**Figura 31B**).

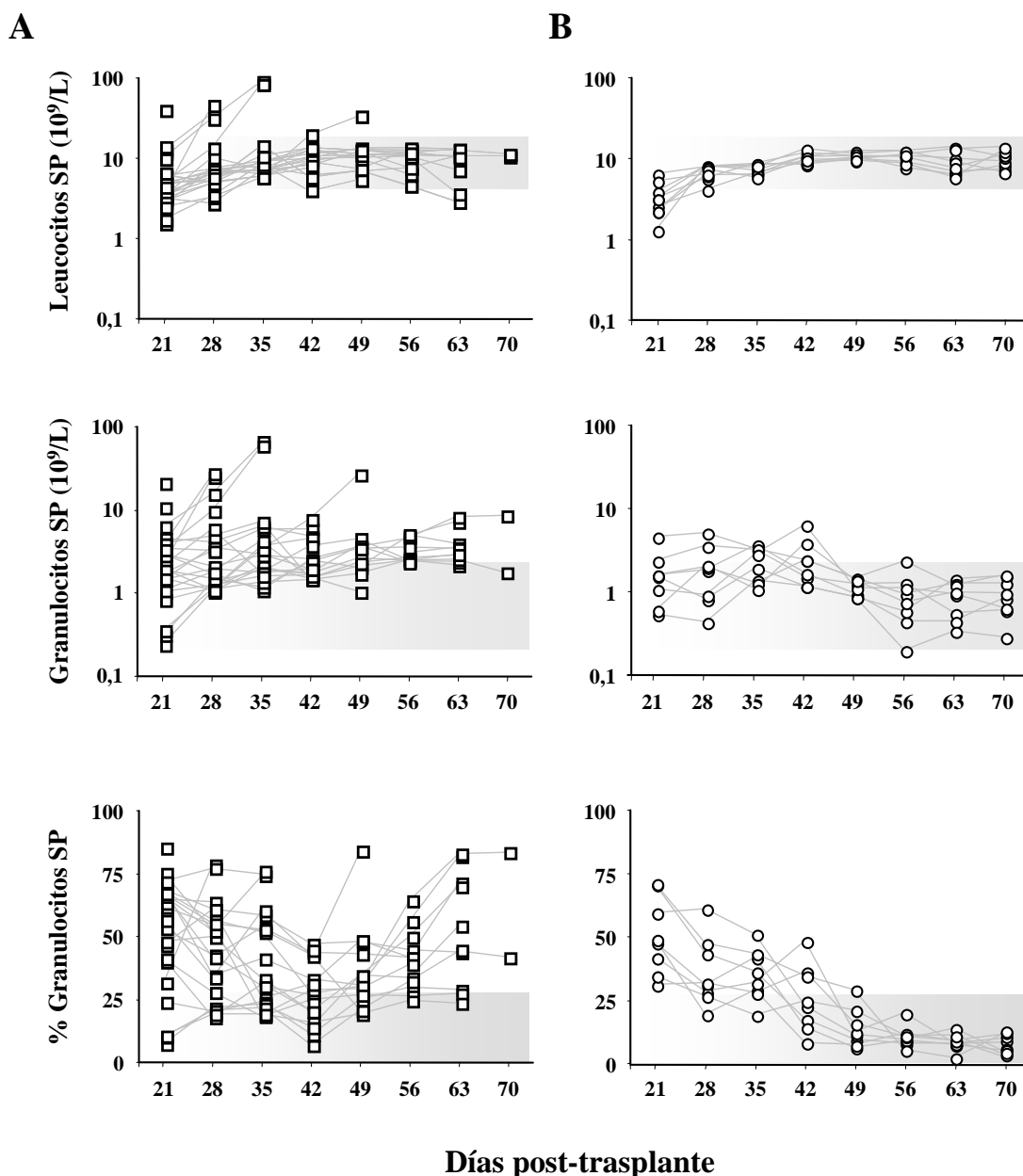


Figura 31: Evolución de los leucocitos y granulocitos en sangre periférica de los ratones (A) del grupo de rLMC hasta el momento de su muerte comparado con la de ratones (B) del grupo control de TPH. El área resaltada en gris muestra el rango de valores normal tras el TPH.

Mediante citometría de flujo se detectaron células NGFR⁺ circulantes en sangre periférica (**Figura 32A**), principalmente granulocitos maduros, metamielocitos y ocasionalmente blastos. El porcentaje total de células NGFR⁺ en el día de la muerte fue del $7 \pm 6\%$ de los leucocitos totales (**Figura 34A**). No se detectaron linfocitos CD3⁺ o B220⁺ que expresaran NGFR.

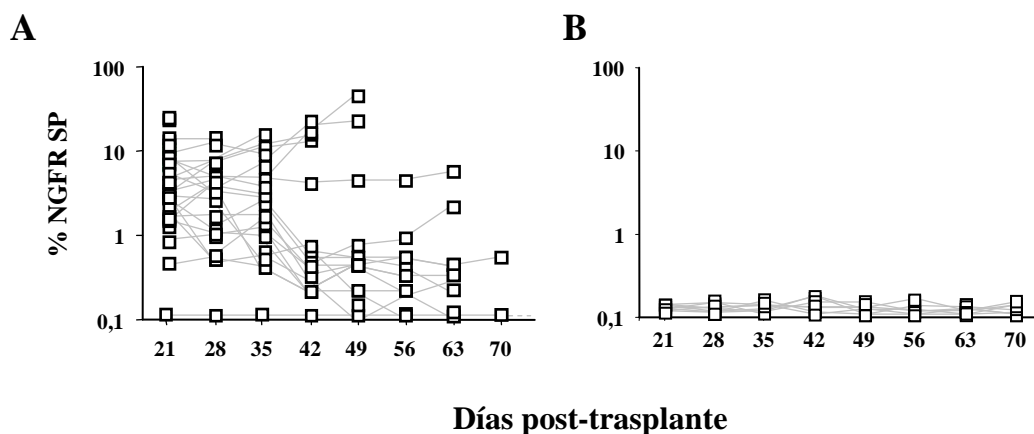


Figura 32: Evolución de células NGFR⁺ detectadas en la sangre periférica de los ratones del grupo (A) rLMC hasta el momento de su muerte comparado con la de ratones (B) del grupo control de TPH.

En las necropsias realizadas a los ratones de este grupo, se observó presencia de hematopoyesis extramedular leucémica demostrada por la expresión de NGFR en las inmunohistoquímicas realizadas en diversos órganos. Así, los bazo estaban aumentados de tamaño alrededor de 3 veces y presentaban un reemplazo de la estructura normal (**Figura 33A**) por una hematopoyesis leucémica (**Figura 33C**), consistente principalmente en leucocitos inmaduros pero también maduros. Esta hematopoyesis era mayoritariamente leucémica, demostrada por la expresión extendida de NGFR detectada por inmunohistoquímica (**Figura 33D**) y por citometría de flujo ($75 \pm 8\%$).

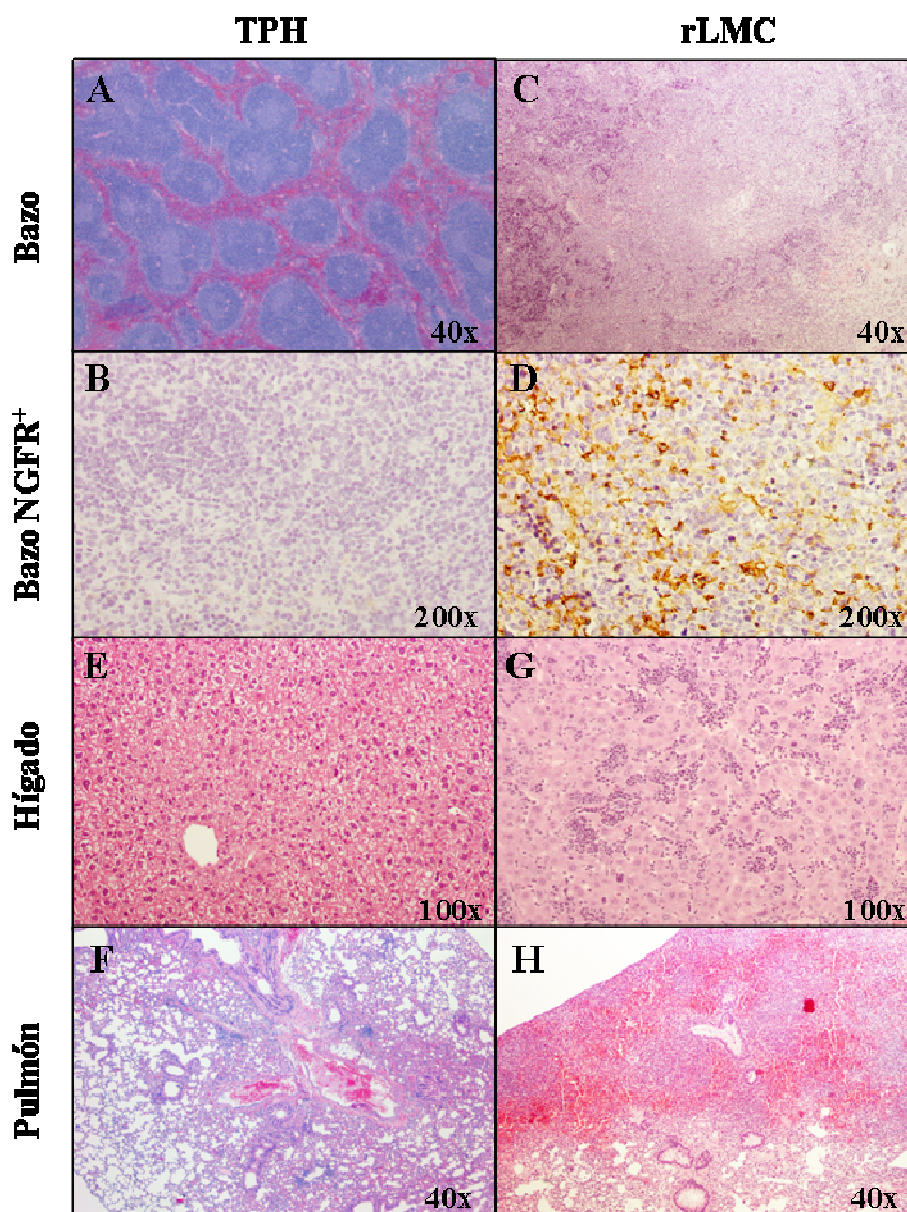


Figura 33: Características histológicas representativas de ratones pertenecientes al grupo rLMC comparados con las de ratones pertenecientes al grupo control TPH. (A) Bazo: estructura normal vs. (C) reemplazo de la estructura normal por infiltración de células hematopoyéticas leucémicas; (B) Inmunohistoquímica de sección de bazo mostrando ausencia de células leucémicas NGFR⁺ vs. (D) detección de células leucémicas NGFR⁺; (E) Hígado: estructura normal vs. (G) reemplazo de la estructura normal por infiltración leucémica masiva en los espacios portales y sinusoidales; (F) Pulmón: estructura normal vs. (H) infiltrados leucémicos, zonas infartadas, y hemorragias intraparenquimales extensas.

Las médulas óseas eran hipercelulares y estaban constituidas principalmente por células mieloides neoplásicas en distintos estadios de maduración con escasa presencia del linaje eritroide (**Figura 35C**). El análisis por citometría de flujo de las médulas óseas en el día de la muerte, mostró un $24 \pm 6\%$ de células NGFR⁺ (**Figura 34B**) confirmado por inmunohistoquímica (**Figura 35D**).

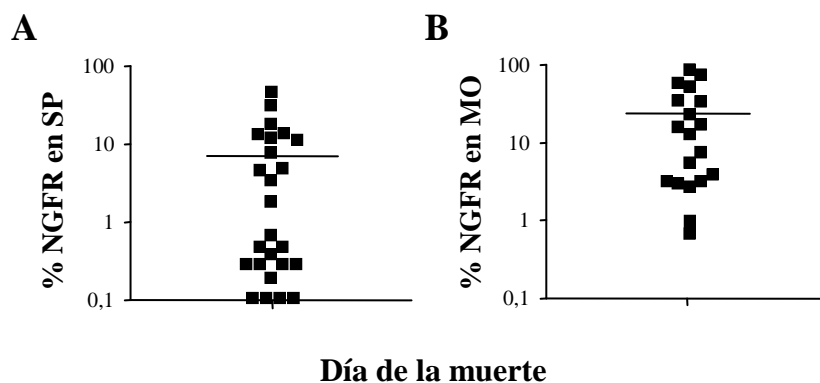


Figura 34: Células (A) de sangre periférica y (B) de MO expresando NGFR en el día de la muerte de los ratones pertenecientes al grupo rLMC.

Los estudios de injerto mostraron un quimerismo mixto detectado mediante citometría de flujo por la presencia de células CD45.1 y CD45.2 en los análisis semanales de sangre periférica y en la MO el día de la muerte de los ratones. Al igual que lo observado en los análisis de sangre periférica, en la médula ósea tampoco se detectaron linfocitos CD3⁺ o B220⁺ expresando NGFR.

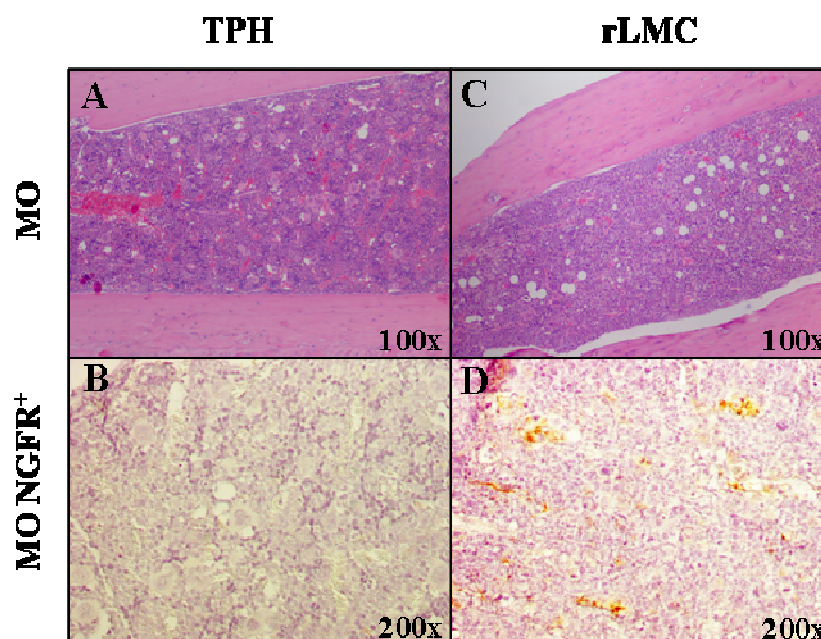


Figura 35: Características histológicas representativas de las MO pertenecientes a los ratones del grupo rLMC comparadas con las de ratones control del grupo TPH. (A) MO normal vs. (C) hiper celularidad constituida principalmente por células neoplásicas en distintos estadios de maduración con una escasa presencia del linaje eritroide. (B) Inmunohistoquímica de sección de MO sin detección de células leucémicas NGFR⁺ vs. (D) detección de numerosas células leucémicas NGFR⁺.

Las necropsias mostraron también hepatomegalias con infiltraciones leucémicas de los espacios portales y sinusoidales (**Figura 33G**). A diferencia de lo que sucede en humanos, se observaron infiltrados leucémicos en pulmones, con presencia frecuente de trombos leucémicos y zonas infartadas, así como hemorragias intraparenquimales extensas (**Figura 33H**).

Algunos ratones de este grupo tuvieron un desarrollo más lento de la enfermedad con una clínica más moderada. Estos ratones presentaron contajes y fórmulas sanguíneas similares a las de los ratones del grupo control de TPH, con una baja detección de células NGFR⁺ ($1,6 \pm 1\%$). Sin embargo, en estos ratones, también se desarrolló un incremento progresivo en el porcentaje de granulocitos en sangre periférica hasta el día de muerte (**Figura 31A**) que se produjo principalmente entre los días 66 y 72, con la supervivencia de sólo un ratón (1/31), que no desarrolló leucemia (**Figura 30**). En las

necropsias, se detectaron mediante inmunohistoquímica áreas leucémicas en bazo y pequeños focos de células NGFR⁺ en médula ósea, que representaban el 5,4±2% de la celularidad detectado por citometría de flujo.

Como grupo control se generó un grupo de trasplante de progenitores hematopoyéticos (Tabla II, grupo TPH, n=17) donde se comprobó la capacidad de reconstitución hematopoyética de las células haploidénticas de MO. El 100% de los ratones pertenecientes a este grupo sobrevivió (**Figura 30**) sin detectarse en ningún caso el desarrollo de EICH. La evolución del injerto en sangre periférica puede observarse en la **Figura 31B**. Adicionalmente, se generó un grupo control en el que los ratones letalmente irradiados no recibían ninguna población celular (Tabla II, grupo Irradiación, n=18). La muerte de estos ratones se produjo entre los días 3 y 13 después de recibir la dosis de irradiación letal (**Figura 30**).

5- LA INFUSIÓN DE LINFOCITOS T HAPLOIDÉNTICOS EN UN MODELO DE RATÓN DE RECAÍDA LEUCÉMICA IMPIDE EL DESARROLLO DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

Con el objetivo de estudiar el efecto ICL sobre el modelo de rLMC, se infundieron esplenocitos alogénicos sobre este modelo, generando así el nuevo modelo de ratón ICL. El efecto ICL está íntimamente relacionado con el EICH, así, fue necesario el desarrollo de un modelo de ratón de EICH como grupo control.

5.1- Desarrollo de un modelo de ratón de EICH en trasplante haploidéntico

Se generó un modelo de ratón de EICH (n=18) según lo descrito previamente¹⁷. Como la médula ósea de ratón no contiene linfocitos T en cantidad suficiente como para generar EICH, fue necesario infundir esplenocitos adicionales (30% de linfocitos T) para generar EICH de forma reproducible. Así, en receptores B6D2F1 (H2^{b/d}) letalmente irradiados, se infundieron 10⁷ células de médula ósea haploidéntica junto con 2,5x10⁷ esplenocitos haploidénticos, ambos procedentes de donantes C57Bl/6 (H2^{b/b}) (**Figura 36**).

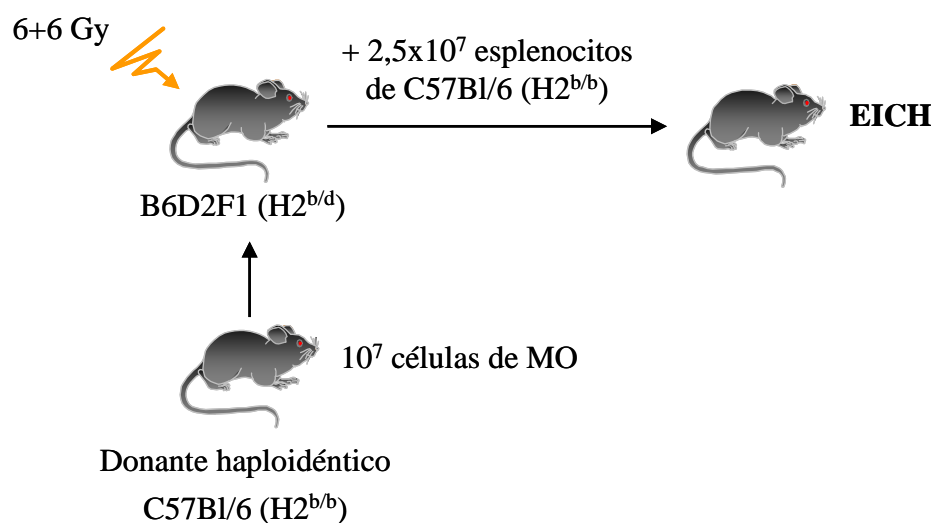


Figura 36: Esquema indicativo del desarrollo del modelo de ratón de EICH.

Alrededor del día 15 post-trasplante, los ratones pertenecientes a este grupo comenzaron a mostrar un cuadro clínico característico de EICH, mostrando un pelaje alterado, aparición de calvas, encorvamiento dorsal, movilidad reducida y pérdida de peso. Los análisis de sangre periférica mostraron una marcada y progresiva leucopenia (**Figura 39A**), siendo la media del conteo de leucocitos en el día de su muerte de $0,6 \pm 0,3 \times 10^9/L$. Los ratones pertenecientes a este grupo murieron o tuvieron que ser sacrificados debido a su mala condición clínica, entre los días 13 y 36 después del trasplante (**Figura 38**). Las MO analizadas eran hipoplásicas. Los principales órganos diana del EICH, piel, hígado e intestino, fueron analizados para determinar el grado de severidad de la enfermedad. Así, se detectaron mayoritariamente zonas correspondientes a EICH grado II-III en piel y a EICH grado II en hígado e intestino.

5.2- Desarrollo de un modelo de ratón de efecto injerto contra leucemia

Para confirmar la capacidad de los esplenocitos infundidos para controlar el desarrollo de la LMC, generamos un modelo de efecto ICL. Para ello, un total de 19 receptores B6D2F1 letalmente irradiados recibieron $2,5 \times 10^7$ esplenocitos de donantes C57Bl/6 además de las células Lin⁻ NGFR⁺ singénicas y las células de MO de donantes C57Bl/6. (**Figura 37**).

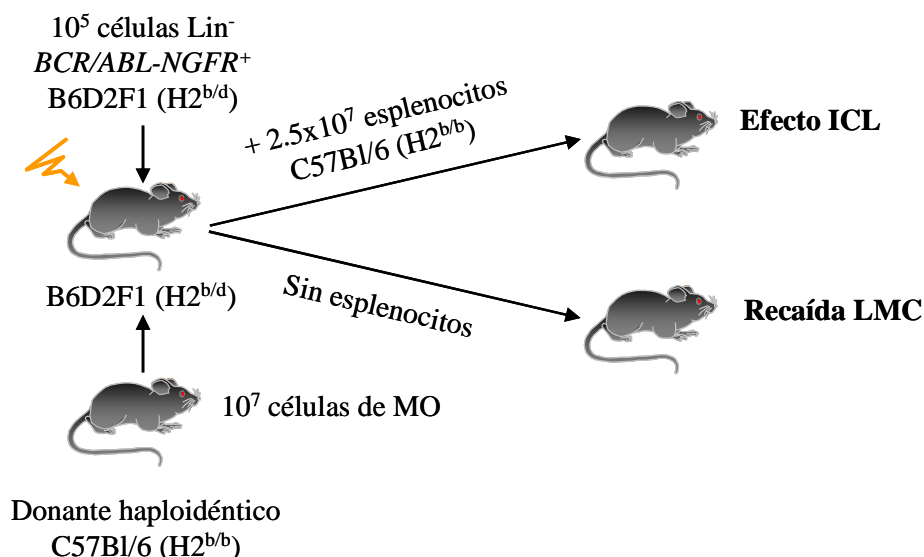


Figura 37: Esquema indicativo del desarrollo del grupo ICL.

Dos semanas después del trasplante, los ratones presentaban leucopenia en sangre periférica y un estado clínico similar al de los ratones pertenecientes al grupo de EICH, es decir, pelaje alterado con la aparición ocasional de calvas, encorvamiento dorsal, movilidad reducida y pérdida de peso. La muerte de los ratones de este grupo se produjo entre los días 13-36 después del trasplante, de manera similar a los ratones del grupo EICH (**Figura 38**).

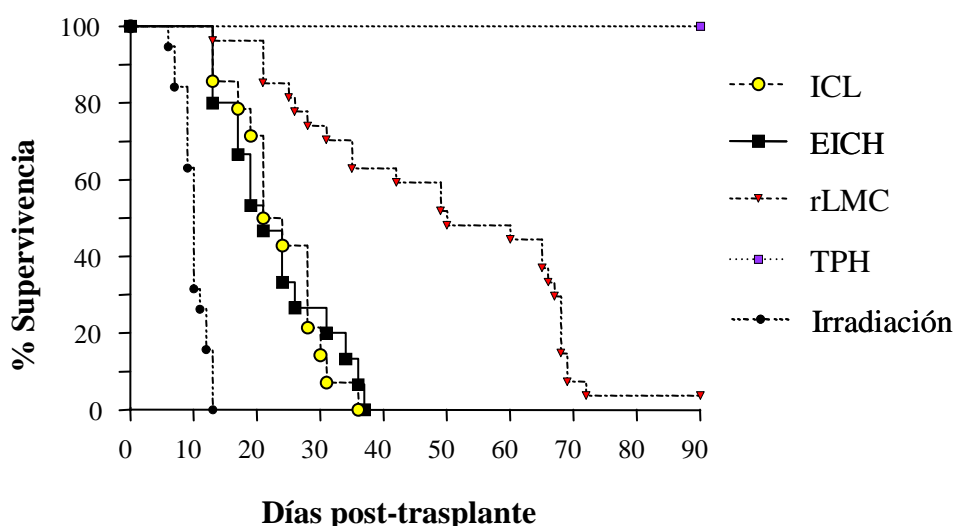


Figura 38: Supervivencia de los ratones pertenecientes a los grupos ICL y EICH comparados con los grupos control de irradiación y de TPH y con el grupo rLMC.

Alrededor del día de muerte, el análisis de sangre periférica mostraban una leucopenia de $1,7 \pm 0,2 \times 10^9/\text{L}$, similar a lo observado en los ratones pertenecientes al grupo control de EICH (**Figura 39A**). En los ratones pertenecientes a este grupo sólo se detectó una proporción muy pequeña de células NGFR^+ en sangre periférica (**Figura 39B**), que descendió progresivamente hasta alcanzar niveles de $0,3 \pm 0,1\%$ de células NGFR^+ el día de la muerte de los ratones determinados por citometría de flujo.

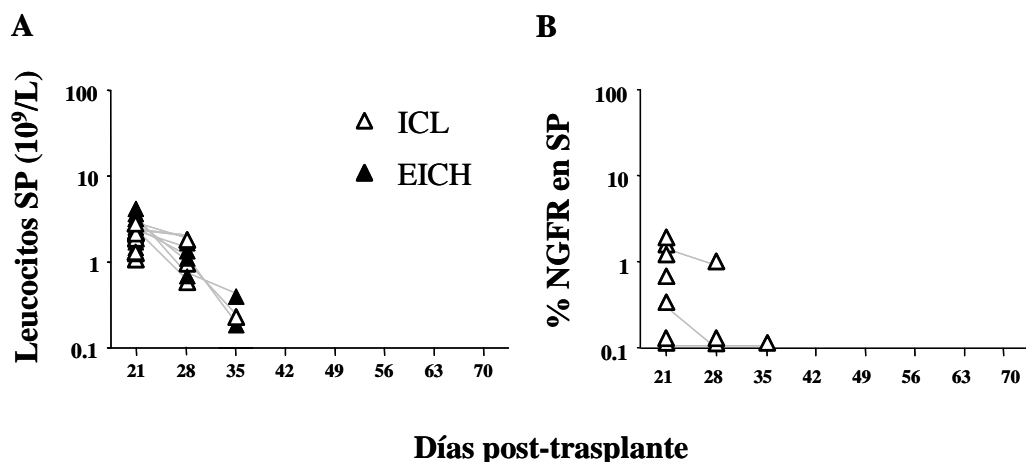


Figura 39: Evolución (A) de los leucocitos en sangre periférica de los ratones pertenecientes a los grupos ICL (triángulos claros) comparada con la de ratones del grupo control de EICH (triángulos oscuros) hasta el momento de su muerte. (B) Evolución de células NGFR^+ en sangre periférica de los ratones del grupo ICL.

Las necropsias no mostraron esplenomegalia, hepatomegalia o infiltrados leucémicos en pulmones, sin detección de NGFR en los órganos analizados mediante inmunohistoquímica. Los bazo analizados mostraron una estructura fibrótica, dilatación sinusoidal y una depleción de la pulpa similar a la encontrada en los ratones pertenecientes al grupo de EICH (**Figura 40A**). La celularidad consistía principalmente en hematopoyesis madurativa sin detección significativa de células NGFR^+ en las inmunohistoquímicas realizadas (**Figura 40B**). Las MO analizadas eran hipoplásicas con grados variables de fibrosis (**Figura 40C**) y sin presencia significativa de células NGFR^+ (**Figura 40D**), que representaban un $0,6 \pm 0,3\%$ en análisis de citometría de flujo el día de la muerte de los ratones. En las necropsias se observó inflamación intestinal asociada a EICH. Se valoró el grado de EICH mediante análisis histológico de los

órganos diana, detectándose mayoritariamente EICH grado II de intestino (**Figura 40E**), con casos aislados de EICH grado III en piel (**Figura 40F**).

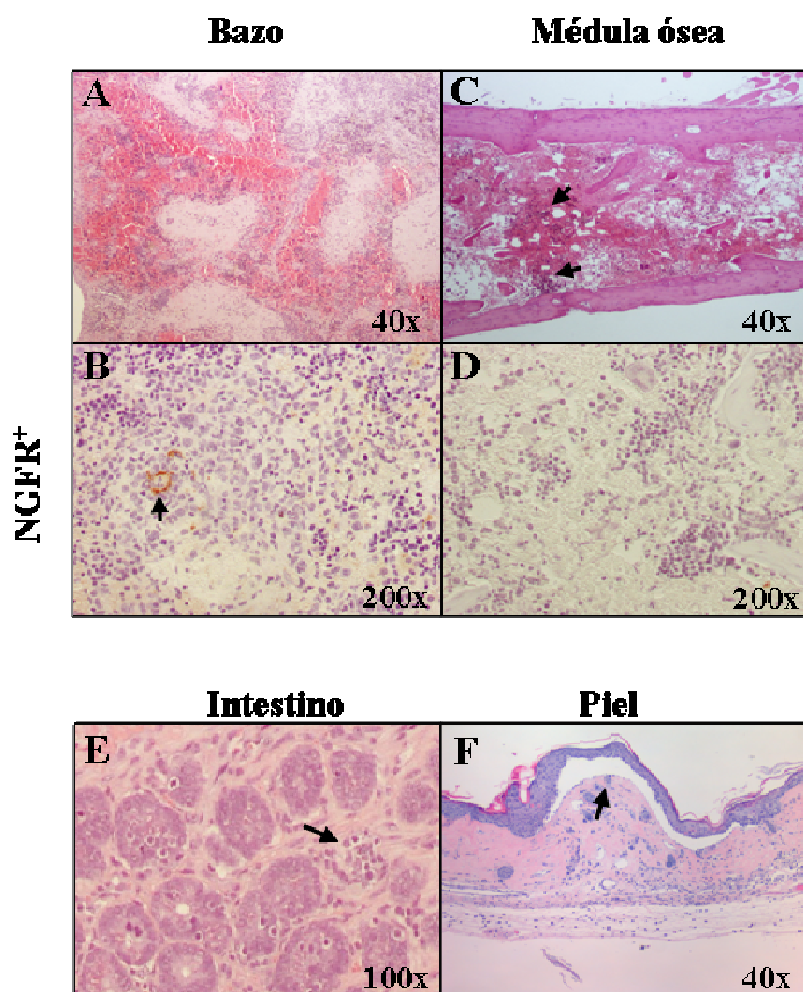


Figura 40: Características histológicas representativas de órganos pertenecientes a los ratones del grupo ICL. (A) Bazo: estructura normal alterada, fibrótica, dilatación sinusoidal y depleción de la pulpa. (C) MO: Aplasia y fibrosis con escasos focos hematopoyéticos (flechas). (E) Intestino: cripta apoptótica (flecha). (F) Piel: queratinocitos apoptóticos y separación de la unión dermo-epidérmica (flecha). Inmunohistoquímica representativa de (B) bazo: células leucémicas aisladas (flecha) y (D) MO: ausencia de células leucémicas.

Los ratones pertenecientes al grupo ICL, sin signos clínicos ni histológicos de LMC y con una escasa detección de células NGFR⁺ por citometría de flujo, presentaron signos clínicos y análisis histológicos similares a los detectados en los ratones pertenecientes al

grupo control EICH, confirmando así el EICH como causa de la muerte de estos ratones.

6- LAS mMSC INFUNDIDAS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE EFECTO INJERTO CONTRA LEUCEMIA TIENEN UNA EFICACIA REDUCIDA EN LA PREVENCIÓN DE EICH

La infusión de las MSC para combatir el EICH podría afectar el efecto ICL, provocando un mayor número de recidivas leucémicas. Por lo tanto, estudiamos el efecto de las propiedades inmunosupresoras de las mMSC en un modelo de ratón de ICL, para analizar su impacto sobre los efectos ICL/EICH.

6.1- La infusión de mMSC previene el desarrollo de EICH en el modelo de ratón de trasplante haploide

En trabajos previos, nuestro grupo demostró que la infusión de mMSC-Ad previene el desarrollo de EICH en un modelo de ratón de trasplante haploide de MO, incrementando su supervivencia ¹⁷. En el presente trabajo, en el modelo de EICH donde se infundían células de MO junto con esplenocitos procedentes de donantes haploide C57Bl/6 (H2^{b/b}) a receptores B6D2F1 (H2^{b/d}) letalmente irradiados (n=20), también se infundieron 2-2,5x10⁵ mMSC-Ad los días 0, 7 y 14 después del trasplante. La infusión por vía intravenosa de todas estas poblaciones celulares provocaba frecuentes muertes por embolismo, por lo que en estos experimentos decidimos infundir las mMSC-Ad por vía intraperitoneal. En experimentos preliminares demostramos que se podía obtener una prevención de EICH similar duplicando las 5x10⁴ mMSC-Ad intravenosas hasta 10⁵ mMSC-Ad por vía intraperitoneal. Para asegurar una inmunosupresión máxima, la dosis final utilizada fue de 2-2,5x10⁵ mMSC-Ad por semana administrada por vía intraperitoneal. La infusión de mMSC, dio como resultado la supervivencia del 60% (56-70% en los seis experimentos realizados) de los ratones pertenecientes al grupo de prevención de EICH (**Figura 43**) confirmando la eficacia de las mMSC en la prevención en el desarrollo de EICH severo.

6.2- Las mMSC tienen menor eficacia para prevenir el EICH en un modelo de ratón de ICL

Para determinar si las propiedades inmunosupresoras de las mMSC, utilizadas para prevenir EICH, podían disminuir la eficacia de los linfocitos T en la erradicación de la enfermedad residual, se infundieron mMSC-Ad en los ratones del grupo ICL. Así, los ratones de este grupo (Tabla II, grupo ICL+MSC, n=26) recibieron las células $\text{Lin}^- \text{NGFR}^+$ singénicas, las células de MO y esplenocitos haploidénticos, además de tres dosis de $2-2,5 \times 10^5$ mMSC-Ad los días 0, 7 y 14 post-trasplante (**Figura 41**).

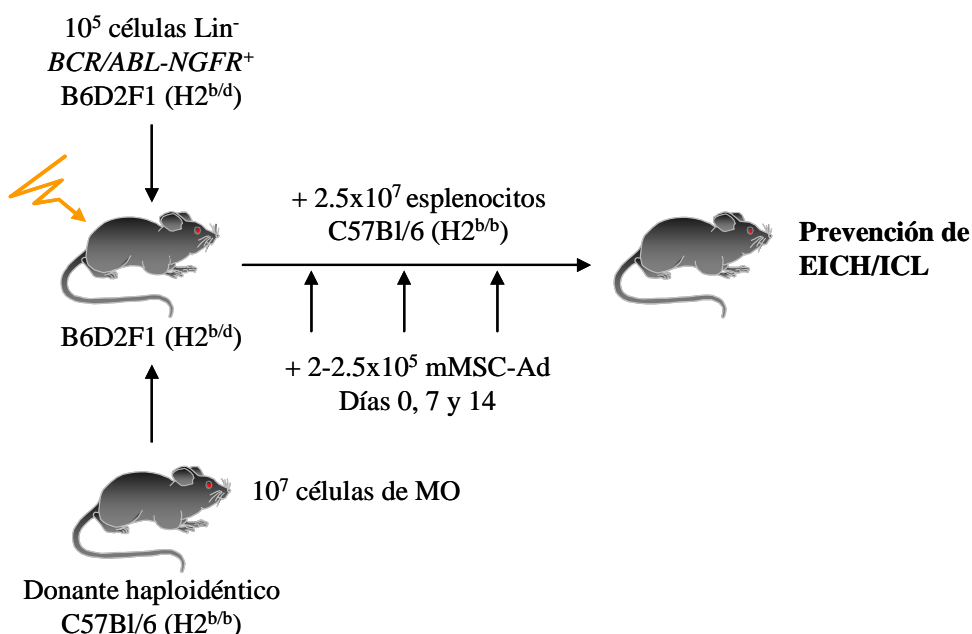


Figura 41: Esquema indicativo del desarrollo del grupo de estudio del efecto de la infusión de mMSC sobre el efecto ICL.

Los ratones pertenecientes a este grupo presentaron un estado clínico saludable, sin signos clínicos de EICH. Los análisis de sangre periférica, al contrario que en los grupos LMC, rLMC e ICL, mostraron un conteaje de leucocitos cercano a lo normal (**Figura 42A**) con escasa proporción de células NGFR^+ (**Figura 42B**), que en el día de la muerte de los ratones representó el $0,7 \pm 0,2\%$ en sangre periférica (**Figura 42C**).

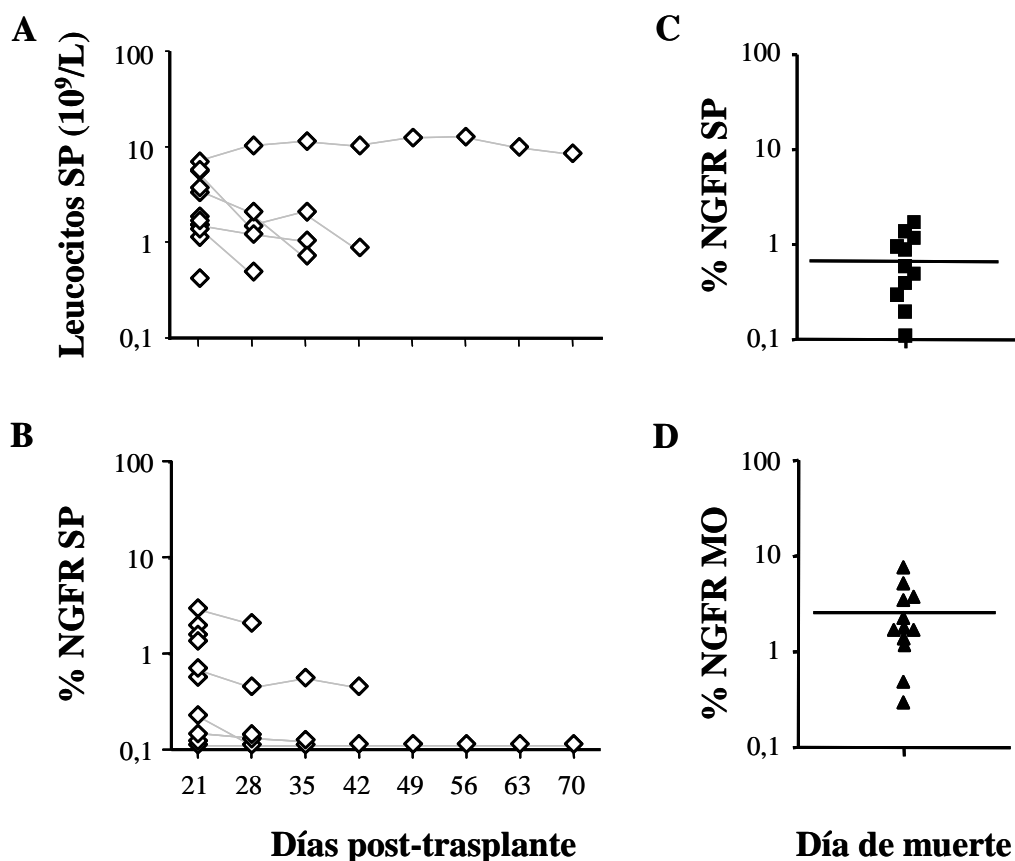


Figura 42: Evolución (A) de los leucocitos y (B) de células $NGFR^+$ en sangre periférica de los ratones pertenecientes a los grupos ICL tras la infusión de mMSC-Ad hasta el momento de su muerte. Porcentaje de células $NGFR^+$ detectadas mediante citometría de flujo en (C) sangre periférica y en (D) médula ósea, el día de la muerte de los ratones pertenecientes a este grupo de estudio.

Sin embargo, los signos de EICH aparecieron pocos días antes de la muerte de cada uno de los ratones (25/26), que se produjo entre los días 13-55 después del trasplante (**Figura 43**), sin diferencias significativas con las curvas de supervivencia a de los grupos ICL o EICH. El ratón superviviente, sacrificado el día 90 después del trasplante, era un ratón sano.

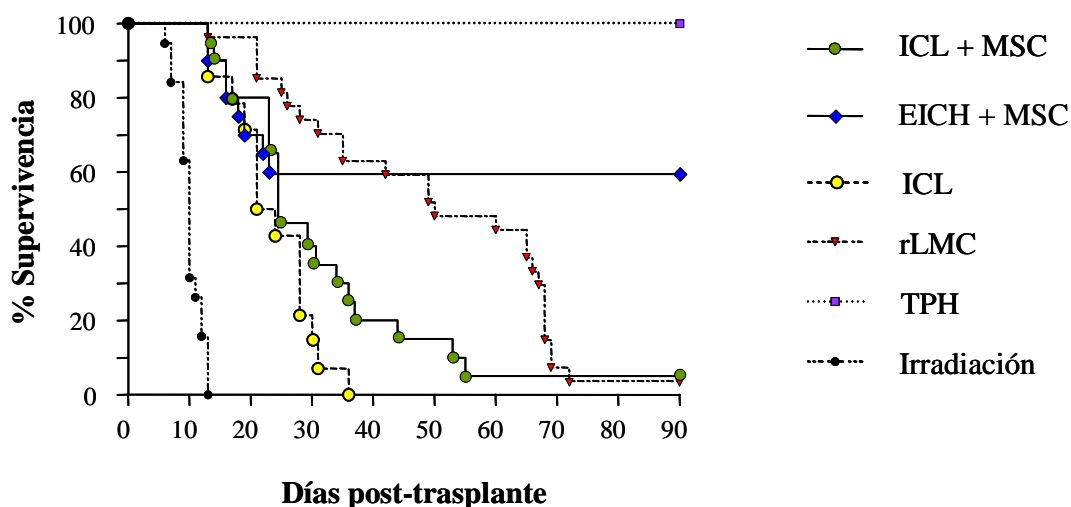


Figura 43: Supervivencia de los ratones pertenecientes a los grupos ICL y EICH con infusión de mMSC-Ad, comparada con el grupo ICL. Curvas de supervivencia de los grupos rLMC, TPH e irradiación.

Las necropsias mostraron bazo, hígados y pulmones de apariencia normal, excepto signos de inflamación intestinal en la mayoría de los ratones. Los análisis histológicos del bazo mostraron una estructura alterada, con fibrosis, dilatación sinusoidal y zonas de hematopoyesis madurativa (**Figura 44A**) y escasas células que expresaban NGFR. La histología de la MO mostró una celularidad heterogénea con zonas hipoplásicas y zonas de hematopoyesis madurativa en distintas secciones del mismo hueso (**Figura 44C**) y pocas células que expresaban NGFR (**Figura 44D**), que alcanzaron el $2,5 \pm 0,6\%$ en análisis de citometría de flujo el día de la muerte de los ratones (**Figura 42D**). Los estudios de quimerismo mostraron un injerto de las células haploideénticas CD45.1 en los análisis semanales de sangre periférica y en la MO el día de la muerte de los ratones. Los signos histológicos de EICH se detectaron en hígado, piel (**Figura 44F**) y particularmente en intestino (**Figura 44E**) donde la mayoría de los ratones mostraron un EICH grado I-II.

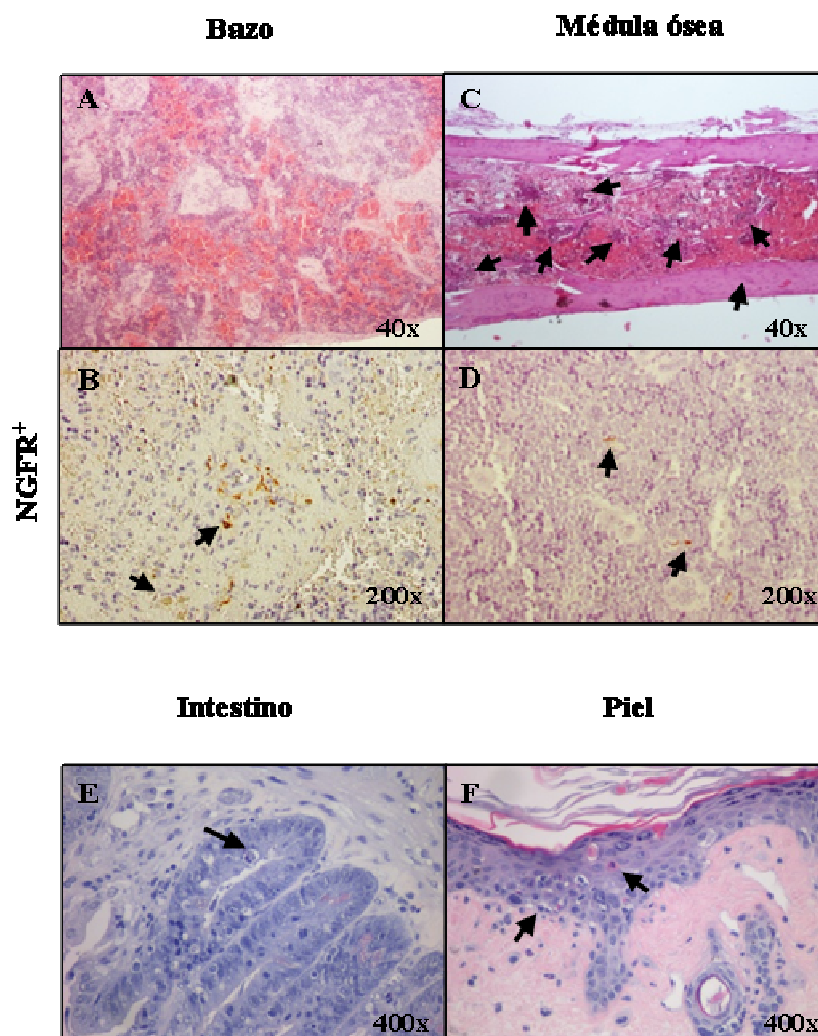


Figura 44: Características histológicas representativas de órganos pertenecientes a los ratones del grupo ICL+mMSC-Ad (A) bazo: estructura alterada debido a la fibrosis, dilatación sinusoidal y zonas de hematopoyesis madurativa. (C) MO: Aplasia y zonas de hematopoyesis madurativa (flechas). (E) intestino: célula apoptótica en la base de la cripta (flecha). (F) piel: degeneración vacuolar de las células epidérmicas basales y queratinocitos apoptóticos (flechas). Inmunohistoquímicas representativas de órganos pertenecientes a los ratones del grupo ICL+mMSC-Ad (B) bazo: células leucémicas expresando NGFR (flechas). (D) MO: células leucémicas aisladas (flechas).

Estos resultados apuntan a que la causa de muerte fue debida a EICH. Sin embargo, la infusión de las mMSC parece haber moderado de forma transitoria su severidad comparada con el grupo control de EICH, pero sin mejorar significativamente su

supervivencia. La detección de células leucémicas en estos ratones podría sugerir que los ratones murieron por EICH antes de poder evaluar el desarrollo final de la leucemia residual.

En un experimento estudiamos si dosis adicionales de mMSC, podían controlar el desarrollo de EICH y favorecer una recidiva leucémica. Para ello, cinco ratones del grupo ICL -que recibieron todas las poblaciones celulares y las 3 dosis programadas de mMSC (días 0, 7 y 14)-, recibieron adicionalmente 2×10^5 mMSC los días 19, 22, 24 y 25 post-trasplante, cuando los signos clínicos característicos de EICH ya eran evidentes. Sin embargo, estas dosis adicionales de mMSC resultaron sólo en una mejoría transitoria de los ratones, produciéndose su muerte alrededor del día 27. Esto representó un retraso de la muerte de alrededor de una semana comparados con ratones del mismo experimento que sólo recibieron las tres dosis de MSC y cuya muerte fue alrededor del día 20 en este experimento en particular. En estos ratones las necropsias también mostraron que la causa de la muerte era debida a EICH, sin que se detectara un incremento en la enfermedad leucémica.

6.3- El oncogén *BCR/ABL* aumenta la respuesta proliferativa de los linfocitos T *in vitro*

Con el objetivo de identificar la causa de la reducida capacidad de las mMSC para prevenir el desarrollo de EICH en un entorno leucémico, estudiamos la respuesta de los linfocitos T a células transducidas con el oncogén humano *BCR/ABL* y el gen marcador *NGFR*. Así, se realizó un cultivo mixto con esplenocitos de ratones C57Bl/6 ($H2^{b/b}$) en co-cultivo con células Lin^- haploidénticas irradiadas de ratones B6D2F1 ($H2^{b/d}$) transducidas o no con el vector retroviral MSCV-p210-ires-NGFR en presencia y ausencia de MSC-Ad irradiadas. Como control sobre la respuesta de los linfocitos T al marcador truncado NGFR, se utilizaron células Lin^- haploidénticas transducidas con el vector retroviral MSCV-ires-NGFR, que codifica solamente NGFR.

La proliferación de los linfocitos T, valorada después de seis días, aumentaba en los co-cultivos en presencia de células Lin^- transducidas con el vector retroviral conteniendo el *BCR/ABL* en comparación con los co-cultivos donde las células Lin^- no habían sido transducidas o habían sido transducidas solamente con el vector retroviral conteniendo el *NGFR* ($p < 0,0001$) (**Figura 45**). La presencia de mMSC, moderaba este incremento

de la proliferación, pero no lo inhibía por completo. Por el contrario, se detectó una inhibición total de la proliferación en los co-cultivos de células Lin⁻ no transducidas o transducidas con el *NGFR*.

Estos resultados apuntan a una exacerbación de la respuesta proliferativa de los linfocitos T en presencia del oncogén humano *BCR/ABL*, siendo las propiedades inmunosupresoras de las mMSC insuficientes para inhibir esta respuesta incluso a ratios altos de mMSC/esplenocitos.

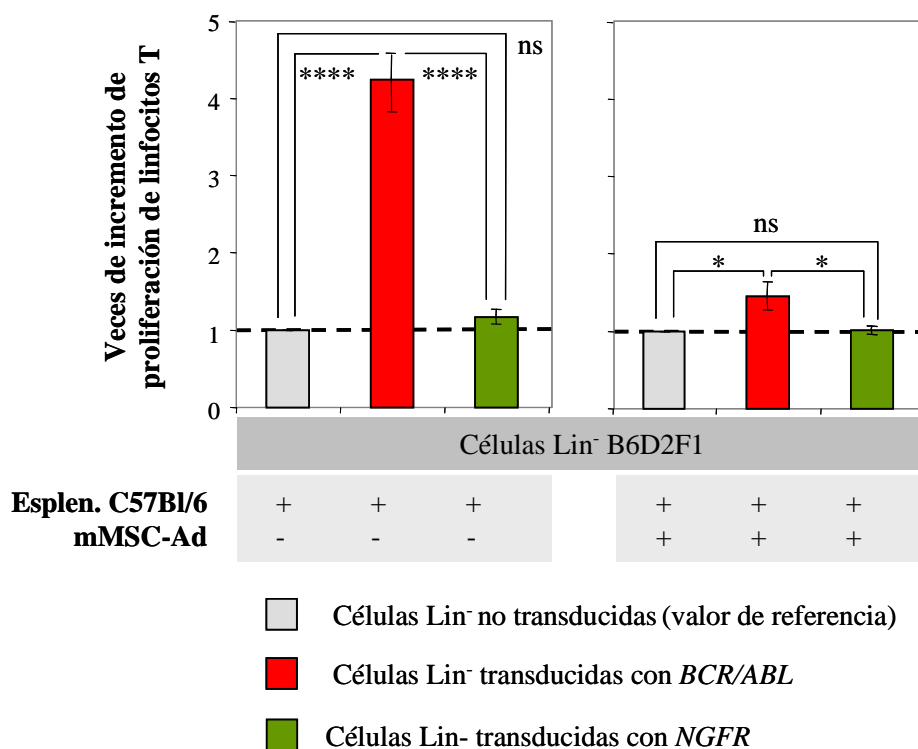


Figura 45: Veces de incremento en la proliferación de linfocitos T en co-cultivo con células Lin⁻ haploidénticas transducidas con el oncogén *BCR/ABL* (barra roja) o transducidas con el gen *NGFR* (barra verde) comparado con células Lin⁻ haploidénticas no transducidas (gris, valor de referencia), con o sin mMSC-Ad (ratio 1:1 mMSC:esplenocitos). Abreviaturas: Esplen.: esplenocitos; **** $p < 0.0001$; * $p < 0.05$; ns: diferencia no significativa.

VIII

- I. ÍNDICE
- II. ABREVIATURAS
- III. RESUMEN
- IV. INTRODUCCIÓN
- V. OBJETIVOS
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS
- VII. RESULTADOS

VIII. DISCUSIÓN

- IX. CONCLUSIONES
- X. BIBLIOGRAFÍA
- XI. ANEXOS

Las MSC son una herramienta prometedora para su aplicación en Terapia Celular debido a que poseen propiedades inmunológicas únicas. Presentan una escasa inmunogenicidad, y ejercen efectos inmunosupresores sobre las principales poblaciones celulares del sistema inmune ^{45,60,88-90}. Basándose en estas propiedades, las MSC han sido utilizadas para tratar EICH severa con buenos resultados ^{60,61}, complicación de los trasplantes de precursores hematopoyéticos alogénicos en la que las CD y los linfocitos T tienen un papel fundamental. A pesar de las expectativas de su uso en clínica, aún quedan muchos aspectos relacionados con las MSC sin resolver. Así, no se conoce en profundidad si existe alguna diferencia entre las MSC obtenidas de diferentes tejidos, ni los mecanismos y factores implicados en sus efectos inmunosupresores o hasta qué punto las propiedades inmunosupresoras de las MSC podrían afectar negativamente el efecto injerto contra leucemia durante los TPH alogénicos.

En esta Tesis Doctoral, nuestro objetivo ha sido generar MSC humanas obtenidas de tejido adiposo comparándolas con MSC obtenidas de MO, e identificar los posibles factores y mecanismos implicados en sus propiedades inmunosupresoras sobre los linfocitos T y las CD. Asimismo, nuestro objetivo ha sido analizar un posible efecto indeseable en la prevención del EICH mediante la infusión de MSC. En particular, nos ha interesado valorar el impacto de las propiedades inmunosupresoras de las MSC sobre el efecto ICL, y valorar un posible aumento de la incidencia de recaídas post-trasplante en un modelo de ratón con leucemia mieloide crónica.

1- EFECTOS INMUNOSUPRESORES DE LAS MSC

1.1- Generación y caracterización de MSC obtenidas de tejido adiposo y de médula ósea

La mayoría de los estudios realizados, tanto en investigación básica como en investigación clínica, se han llevado a cabo con hMSC obtenidas de MO, por lo que quisimos comprobar si existen diferencias entre estas hMSC y las obtenidas de tejido adiposo. Las MSC no poseen un inmunofenotipo específico que las caracterice, por lo que se identifican mediante el análisis de antígenos de superficie presentes o ausentes en las células. En nuestros estudios, comprobamos que el inmunofenotipo de las hMSC-Ad y las hMSC-MO es similar. Observamos que en ambas poblaciones se expresan CD13, CD29, CD44, CD73, CD166 y HLA clase I y no se expresan marcadores de linaje

hematopoyéticos como CD34 y CD45 o HLA clase II. En la literatura científica existe controversia sobre la presencia del antígeno hematopoyético CD34, pues hay estudios realizados con hMSC-Ad en los que se describe la expresión de CD34^{18,21}. Estos resultados contradictorios podrían deberse en gran medida a la realización del análisis en momentos precoces del cultivo o a las diferentes condiciones de cultivo utilizadas. Así, existen estudios que sugieren que el tiempo durante el cual las hMSC son mantenidas en crecimiento en adherencia en plástico y el medio de cultivo utilizado varían significativamente el perfil fenotípico de la superficie celular de las hMSC²⁰.

La *International Society for Cell Therapy* (ISCT) ha establecido una serie de recomendaciones con respecto a los criterios que deben cumplir las hMSC en cultivos *in vitro*²³, con el objetivo de unificar la caracterización de las MSC. En estas recomendaciones se apoya la negatividad del antígeno CD34, en concordancia con los resultados obtenidos por otros grupos⁹¹ y por nosotros. De acuerdo con las recomendaciones de la ISCT, comprobamos la capacidad de diferenciación de las MSC hacia otros tejidos, y verificamos que tanto las hMSC-Ad como las hMSC-MO eran capaces de diferenciar *in vitro* hacia el tejido adiposo y el tejido óseo.

Uno de nuestros objetivos era el desarrollo de un modelo de ratón para analizar los efectos de la infusión de las MSC en el efecto ICL, por lo que generamos MSC a partir de tejido adiposo de ratón. Comprobamos que las MSC así obtenidas tienen características similares a las hMSC-Ad, presentan un aspecto fibroblastoide en crecimiento en adherencia, son negativas para CD34, CD45 y CD117, positivas para Sca-1, CD29, CD44, CD73 y CD105, y son capaces de diferenciar *in vitro* hacia el tejido óseo y el tejido adiposo.

1.2- Efectos inmunosupresores de las MSC-Ad y de las MSC-MO sobre los linfocitos T

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar los efectos inmunosupresores de las MSC humanas sobre los linfocitos T y CD, principales poblaciones implicadas en el desarrollo de EICH tras un TPH alogénico, así como los factores que podrían estar implicados en estos efectos.

En primer lugar, analizamos los efectos de las hMSC sobre la proliferación de linfocitos T activados en respuesta a mitógenos y a estímulos alogénicos, comparando las hMSC-Ad con las hMSC-MO. Comprobamos que ambos tipos celulares inhiben la proliferación de forma dosis dependiente. Para profundizar en estos efectos, analizamos la variación en la expresión génica de los factores implicados en la proliferación celular en los co-cultivos de linfocitos T activados/hMSC. La presencia de las hMSC-Ad y hMSC-MO en estos cultivos resultó en una disminución considerable de la expresión de ARNm de los factores de proliferación CCNE1, PCNA, CDK2 y E2F1 en los linfocitos T, en concordancia con la inhibición de la proliferación detectada.

En nuestros estudios, analizamos si la inhibición de la proliferación cambiaba el patrón de secreción de citoquinas de los linfocitos T activados. Observamos que la presencia de hMSC-Ad o de hMSC-MO en estos cultivos producía una disminución en la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias (IFN- γ , TNF- α , IL-6 y IL-12) y un incremento de la anti-inflamatoria IL-10, en concordancia con lo descrito para las MSC derivadas de MO²⁹ y con lo previamente observado por nuestro grupo para las MSC derivadas de tejido adiposo¹⁷.

Como hemos mencionado, los mecanismos implicados en las propiedades inmunosupresoras de las MSC no son del todo conocidos, pero se sabe que actúan a través de factores solubles, aunque el contacto célula-célula puede aumentar los efectos⁹². Se han estudiado y propuesto varios factores solubles como TGF- β ³⁰, IDO⁵¹, IFN- γ ⁸⁷, IL-10³⁴ o PGE₂^{32, 88, 93}, como posibles mediadores de estos efectos inmunomoduladores; pero los resultados no son concluyentes y, en ocasiones, son contradictorios entre los distintos grupos^{94, 95}.

Un posible factor responsable de la inhibición en la proliferación observada en estos co-cultivos es la PGE₂, pequeña molécula lipídica que regula numerosos procesos en el ser humano incluida la función inmune^{55, 96}. En particular, la PGE₂ posee un efecto directo inhibitorio de la proliferación y producción de citoquinas de los linfocitos T, afectando la liberación de Ca²⁺ intracelular⁵³ y la actividad tirosina quinasa de la proteína p59⁵⁴.

En los co-cultivos en los que la adición de hMSC-Ad inhibía la proliferación de linfocitos T activados encontramos niveles altos de PGE₂, de manera similar a la descrita para las hMSC-MO^{32, 88}, y en comparación con los niveles obtenidos en los cultivos de hMSC-Ad o de linfocitos T activados. En nuestros experimentos, el bloqueo de PGE₂ mediante IDM, resultó en una conservación de la capacidad de proliferación de los linfocitos T en co-cultivo con hMSC-Ad y, en concordancia, aumentó la expresión de ARNm de los factores de proliferación. Sin embargo, de forma sorprendente, esta conservación de la capacidad de proliferación no se acompañó de un aumento en la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias producidas por los linfocitos T activados. El bloqueo de PGE₂ en los co-cultivos hMSC-Ad/linfocitos T produjo una disminución significativa -en el momento del análisis- de la secreción de IL-10, una de cuyas funciones es regular de forma negativa la respuesta inmune celular, y por lo tanto favoreciendo la proliferación de los linfocitos T. Es decir, que el bloqueo de PGE₂ tiene un efecto más inmediato y evidente sobre la producción de IL-10 que sobre la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Los resultados obtenidos en los co-cultivos con hMSC-Ad fueron similares a los obtenidos en los co-cultivos con hMSC-MO.

A pesar de que nuestros experimentos se reprodujeron de forma consistente, distintos grupos describen efectos distintos para la PGE₂. Rasmunsson y Tse demuestran que el bloqueo de PGE₂ reestablece la proliferación de linfocitos T inducida por mitógenos pero no la inducida por estímulos alogénicos^{24, 88}; Aggarwal describe que se restaura la proliferación y la secreción de IFN- γ por linfocitos T activados³². Finalmente, Glennie muestra el reestablecimiento de un perfil de secreción de citoquinas Th1 pero no la proliferación de los linfocitos T activados⁹⁷. Las diferencias encontradas en la literatura podrían ser debidas, al menos en parte, a la distinta metodología empleada en la realización de los experimentos, tales como el tiempo de co-cultivo o el ratio hMSC/linfocitos T utilizados, más que a diferencias entre las fuentes de MSC. A pesar de estas diferencias, no hay duda de que PGE₂ tiene un papel importante en la mediación de los efectos inmunosupresores de las hMSC sobre los linfocitos T activados, aunque no se puede excluir la participación de otros factores en estos efectos.

Para determinar qué población de linfocitos T activados estaba proliferando pero no secretando citoquinas después del bloqueo de la PGE₂, estudiamos los niveles de ARNm de los factores de transcripción implicados en la polarización Th1/Th2/Th17 en

los co-cultivos hMSC-Ad/linfocitos T activados. El bloqueo de PGE₂ aumentó la expresión de los factores de transcripción implicados en las dos vías de polarización Th1/Th2, así como la expresión de ARNm de citoquinas representativas de las subpoblaciones Th1 (IFN- γ e IL-12) y Th2 (IL-5), a pesar de que no se detectó secreción de citoquinas.

Sin embargo, en los co-cultivos de linfocitos T con MSC derivadas de médula ósea, sólo se detectó un ligero incremento en la expresión de ARNm de IL-12 e IL-5. A pesar de esto, dado que la caracterización celular^{91, 98} y las propiedades inmunosupresoras de las hMSC-Ad^{17, 63} y hMSC-MO⁶¹ han resultado ser muy similares en todos los estudios disponibles hasta la fecha, estas diferencias podrían ser indicativas únicamente de un tiempo diferente de desarrollo del efecto producido por ambos tipos de hMSC.

1.3- Efectos de las MSC-Ad y de las MSC-MO sobre la maduración de las células dendríticas

Las CD fueron la segunda población del sistema inmune objeto de nuestro estudio, ya que son responsables de la captación, procesamiento y presentación antigénica a los linfocitos T, y por lo tanto, con una función importante en el desarrollo del EICH. Trabajos previos han demostrado que las hMSC-MO inhiben la generación y función de las CD-m^{35, 39, 93}, lo que resulta en una presentación antigénica defectuosa y una respuesta inmune ineficaz. Centrándonos en estudiar el efecto de las hMSC-Ad y de las hMSC-MO sobre la maduración de las CD-m, realizamos cultivos de CD-m inmaduras con hMSC-Ad. A las 48h de co-cultivo añadimos LPS, observando una inhibición de la maduración de las CD-m, demostrada por el inmunofenotipo inmaduro y la disminución de la secreción de citoquinas. En otros experimentos añadimos LPS simultáneamente con las MSC en co-cultivos con CD inmaduras, para ver si el efecto inhibitor de las MSC se ejercía sobre el final de la diferenciación de las CD más que sobre la inducción de la maduración. Los resultados obtenidos fueron similares en ambos casos, manteniéndose las CD-m en un estado inmaduro. El efecto de las hMSC sobre la maduración de las CD-m resultó en una incapacidad de las CD-m para inducir la proliferación de linfocitos T alogénicos en un cultivo mixto linfocitario. Los resultados fueron similares cuando se utilizaron hMSC-MO en los co-cultivos, en concordancia con trabajos publicados por otros autores^{35, 38} pero contradictorios con los hallazgos de

Spaggiari, en los que no se encontró efecto de las hMSC-MO sobre la maduración tardía de las CD-m inmaduras inducida por LPS ⁹³.

En estos co-cultivos, encontramos niveles de PGE₂ significativamente aumentados, en comparación con los observados en los cultivos de hMSC, lo que podría indicar su implicación como mediador de los efectos inmunosupresores de las hMSC. Sin embargo, la adición de IDM a los co-cultivos, no resultó en la maduración de las CD-m, que se mantuvieron en un estado inmaduro. Esto podría evidenciar que PGE₂ no tiene un papel principal en el efecto de las hMSC-Ad y hMSC-MO sobre la maduración de las CD-m, o que sólo el bloqueo de PGE₂ no es suficiente para permitir la maduración de las CD-m, probablemente por la posible acción de factores coadyuvantes no identificados.

En nuestro trabajo, también estudiamos el efecto de las hMSC-Ad y hMSC-MO sobre la maduración de las CD-p. Observamos que las hMSC-Ad y hMSC-MO también provocan un defecto en la maduración de estas células, demostrado por un incremento de IL-10 -hasta valores tan elevados que afectan la expresión de las moléculas del CMH ⁵²- y por un inmunofenotipo inmaduro. En nuestros experimentos, encontramos niveles muy elevados de PGE₂ en los cultivos de CD-p con MSC-Ad. A diferencia de lo observado con las CD-m, la adición de IDM permitió la maduración de las CD-p, detectada por una disminución de los niveles de IL-10 a valores similares a los obtenidos en los cultivos de CD-p maduras. Esto demuestra que PGE₂ es un factor soluble implicado en el efecto de las hMSC-Ad y hMSC-MO sobre la inhibición de la maduración de las CD-p.

2- DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE EFECTO INJERTO CONTRA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

En un TPH alogénico utilizado para tratar enfermedades oncohematológicas, uno de los principales efectos curativos es el mediado por el efecto ICL, en el que los linfocitos T del donante reconocen antígenos tumorales presentes en las células leucémicas como no propios, desencadenando una respuesta inmune y destruyéndolas ^{68, 99, 100}. De este modo, el efecto ICL contribuye a la erradicación de la enfermedad mínima residual y reduce las recidivas tras el TPH alogénico. Sin embargo, este efecto beneficioso de los

linfocitos T del donante, está estrechamente relacionado con el desarrollo de EICH, complicación frecuente y potencialmente letal de los TPH alogénicos.

El hallazgo de que las MSC tienen propiedades inmunosupresoras sobre las poblaciones del sistema inmune implicadas en el desarrollo de EICH, llevó a su uso en pacientes para tratar EICH severa resistente a corticoides ⁶⁰⁻⁶². Esta utilización resultó en un aumento de la supervivencia de un porcentaje importante de los pacientes, sin observarse efectos adversos debido a la infusión de MSC. Sin embargo, uno de los posibles inconvenientes de la inmunosupresión mediada por las MSC para prevenir el desarrollo de EICH podría afectar y reducir el efecto beneficioso ICL, favoreciendo un aumento de recidivas leucémicas. Ante esta posibilidad es evidente la necesidad de desarrollar modelos animales donde el balance entre las consecuencias positivas y negativas de la prevención de EICH en TPH alogénicos pueda ser estudiado.

En nuestro trabajo hemos desarrollado un modelo de efecto ICL en ratones con LMC en recaída post-TPH. Elegimos la LMC porque esta enfermedad es la patología oncohematológica en la que el efecto ICL es más eficaz. Este efecto se evidenció en los buenos resultados obtenidos al tratar recaídas de LMC post-TPH alogénico mediante la infusión de linfocitos T de donante. Descartamos el uso de líneas celulares leucémicas para la generación de LMC ¹⁰¹ para evitar posibles problemas derivados del uso de células procedentes de distintas cepas de ratón que pudieran afectar a los resultados finales. Así, verificamos que la infusión de progenitores hematopoyéticos singénicos transducidos con el vector retroviral conteniendo el oncogén humano *BCR/ABL*, generaba un síndrome mieloproliferativo similar a una LMC, que mató a los ratones en una media de 18 días.

Con el objetivo de mimetizar una recidiva generada por células leucémicas residuales, similar a las observadas en pacientes trasplantados, generamos el modelo de recaída de LMC, en el que progenitores hematopoyéticos transducidos con el *BCR/ABL* sólo representaban una pequeña proporción de las células infundidas. La infusión de las células leucémicas, conjuntamente con médula ósea haploidéntica, resultó en el desarrollo de un síndrome mieloproliferativo semejante a una recidiva de LMC, que mató a los ratones en un período aproximado de dos meses. La infusión adicional de esplenocitos en el modelo de recaída de LMC previno el desarrollo del síndrome

mieloproliferativo. Esto confirmó la capacidad de los linfocitos T para generar un efecto injerto contra leucemia capaz de controlar el desarrollo de la enfermedad. En este grupo, los ratones murieron de EICH en un período de tiempo similar al del grupo control de EICH.

3- ESTUDIO DEL IMPACTO DE LAS PROPIEDADES INMUNOSUPRESORAS DE LAS MSC SOBRE EL EFECTO INJERTO CONTRA LEUCEMIA

Como hemos mencionado, las MSC se utilizan para tratar EICH severa resistente a corticoides, una complicación potencialmente letal para el paciente⁶⁰⁻⁶². Sin embargo, la posibilidad de utilizar MSC de forma preventiva en un TPH alogénico de riesgo estándar debería considerarse con precaución, pues sus propiedades inmunosupresoras podrían disminuir la eficacia del efecto ICL y producir un aumento de recidivas. En este sentido, algunos trabajos experimentales han demostrado que la infusión de MSC fue permisiva con el desarrollo de ciertos tumores sólidos en ratones inmunocompetentes, así como un aumento de su potencial metastático^{71, 72}. Por ello, en el presente estudio, uno de nuestros objetivos fue analizar el impacto que las propiedades inmunosupresoras de las mMSC-Ad pueden tener sobre el efecto ICL en nuestro modelo de ratón con recaída de LMC.

En un trabajo previo, nuestro grupo describió un modelo de ratón en donde tres infusiones de 5×10^4 mMSC-Ad administradas los días 0, 7 y 14 tras el TPH, prevenían el desarrollo de EICH¹⁷. En este modelo, en lugar de la administración intravenosa, decidimos infundir las mMSC-Ad por vía intraperitoneal, para evitar fenómenos de tromboembolismo. En experimentos preliminares comprobamos que la infusión intraperitoneal de 10^5 mMSC-Ad/semana previene el EICH de forma similar a la obtenida por vía intravenosa. Considerando que las propiedades inmunosupresoras de las MSC actúan de manera dosis dependiente^{32, 88, 102}, para asegurar una máxima inmunosupresión incrementamos el número de mMSC-Ad hasta $2-2,5 \times 10^5$ mMSC-Ad/semana.

Los resultados obtenidos en los seis experimentos realizados fueron reproducibles. Como hemos descrito, la infusión de linfocitos T previno el desarrollo de leucemia en el grupo de estudio ICL y los ratones murieron de EICH en un período de tiempo

similar al del grupo control de EICH. Habíamos previsto que la infusión de mMSC-Ad en este grupo podría moderar el efecto ICL debido a una disminución en la reactividad de los linfocitos T, evitando la incompleta eliminación de células leucémicas residuales y aumentando las recidivas en algunos de los ratones. Sin embargo, de forma totalmente inesperada, aunque los signos clínicos de EICH fueron más moderados y el período de supervivencia fue algo mayor, los ratones murieron de EICH y no de leucemia, a pesar de la alta dosis de mMSC-Ad infundidas. En este grupo pudo detectarse una pequeña proporción de células leucémicas en el bazo y en la médula ósea, al contrario de lo que observamos en el grupo ICL, en el que prácticamente no se encontraron células NGFR⁺. El grupo control de prevención de EICH tuvo una supervivencia del 60%, acorde con lo esperado. Esta supervivencia confirmó que tanto las dosis de mMSC-Ad infundidas, como el patrón de administración de las mismas, fueron efectivos en la prevención de EICH.

Estudiamos si infusiones adicionales de mMSC-Ad podían controlar el desarrollo de EICH y favorecer así posibles recidivas leucémicas. Para analizarlo, en cinco ratones del grupo ICL que habían recibido las tres dosis de mMSC-Ad programadas, se les infundieron cuatro dosis adicionales. El resultado nuevamente fue el desarrollo de EICH letal, sin incremento en recaída leucémica. Estos resultados sugerirían que la reducida eficacia de las mMSC-Ad para prevenir el desarrollo de EICH en el contexto del modelo de LMC es debida a un evento relacionado con la leucemia más que con las dosis de mMSC infundidas.

Una de las posibles explicaciones de estos resultados podría ser una respuesta inmune exacerbada de los linfocitos T contra las células leucémicas que contienen el oncogén *BCR/ABL*. Esta posibilidad se basa en que las CD tienen un papel fundamental en EICH y en el efecto ICL. Tras un TPH, las CD del receptor permanecen presentes durante un período de tiempo ^{86, 103}. Estas CD pueden presentar el antígeno *BCR/ABL* a los linfocitos T del donante y así generar una fuerte respuesta inmune. Pero de mayor relevancia es que la presentación antigénica en la LMC es realizada por CD derivadas de los progenitores leucémicos que expresan el gen *BCR/ABL* ¹⁰⁴⁻¹⁰⁷. La proteína de fusión *BCR/ABL*, característica de LMC, es capaz de inducir una fuerte respuesta citotóxica de los linfocitos T que reconocen las células tumorales ¹⁰⁸. Esta es la

propiedad que justifica el tratamiento de pacientes utilizando linfocitos T citotóxicos reactivos específicos contra las células leucémicas¹⁰⁹.

Para analizar esta posibilidad, estudiamos la respuesta *in vitro* de los linfocitos T frente a las células Lin⁻ transducidas con el oncogén *BCR/ABL*. Así, se detectó un incremento muy significativo de la proliferación de linfocitos T en co-cultivo con células Lin⁻ transducidas con el oncogén *BCR/ABL* comparada con la respuesta frente a células Lin⁻ no transducidas o transducidas con el gen *NGFR*. La adición de mMSC-Ad a estos co-cultivos, resultó en la prevención de la proliferación en los co-cultivos de linfocitos T con células Lin⁻ no transducidas o transducidas con el gen *NGFR*. Sin embargo, en los co-cultivos con células Lin⁻ transducidas con el oncogén *BCR/ABL*, la adición de mMSC-Ad no fue capaz de inhibir por completo esta proliferación, aún en ratios elevados (1 mMSC: 1 esplenocito respondedor).

En nuestro modelo *in vivo*, la respuesta inmune frente las células conteniendo el oncogén *BCR/ABL* podría sumarse al EICH desarrollado tras la infusión de esplenocitos haploidénticos en un contexto inflamatorio tras la irradiación de los receptores, contribuyendo a la respuesta exacerbada de los linfocitos T. En este contexto, la capacidad inmunosupresora de las mMSC podría ser superada por la intensidad de la respuesta inmune. Esto explicaría la falta de eficacia de las MSC para prevenir EICH en este modelo de ratón de ICL, al contrario de lo observado en un modelo de ratón donde no están presentes las células transducidas con el oncogén *BCR/ABL*.

En nuestro trabajo, la infusión de una gran cantidad de mMSC no indujo un incremento evidente en las recidivas leucémicas. Sin embargo, para asemejar nuestro modelo a una aplicación clínica en pacientes, la combinación de MSC con otros tratamientos inmunosupresores debe ser evaluada para confirmar nuestras observaciones.

IX

- I. ÍNDICE
- II. ABREVIATURAS
- III. RESUMEN
- IV. INTRODUCCIÓN
- V. OBJETIVOS
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSIÓN

IX. CONCLUSIONES

- X. BIBLIOGRAFÍA
- XI. ANEXOS

- 1- Las hMSC derivadas de tejido adiposo tienen morfología, inmunofenotipo, y capacidad de diferenciación hacia tejido óseo y tejido adiposo similar a las hMSC derivadas de médula ósea.
- 2- Tanto las hMSC-Ad como las hMSC-MO suprimen la proliferación de linfocitos T activados y cambian su patrón de secreción de citoquinas de un perfil pro-inflamatorio a uno anti-inflamatorio.
- 3- PGE₂ es un factor soluble que media en el efecto inhibitor de las hMSC-Ad y las hMSC-MO sobre la respuesta proliferativa de linfocitos T activados con estímulos mitogénicos o alogénicos.
- 4- La inhibición de PGE₂ en co-cultivos de hMSC-Ad y de hMSC-MO con linfocitos T activados, aunque permite la proliferación de los linfocitos T, sólo restaura la secreción de IL-10. En estos cultivos, no se detecta la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias (IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-6) a pesar del aumento en la expresión de sus ARNm.
- 5- Las hMSC-Ad y las hMSC-MO impiden la maduración de las CD-m y CD-p, lo que se confirma por su inmunofenotipo y patrón de secreción de citoquinas, resultando en una incorrecta estimulación de los linfocitos T. PGE₂ es un factor soluble implicado en el efecto de las hMSC-Ad y las hMSC-MO sobre la maduración de las CD-p, pero no de las CD-m.
- 6- La infusión en ratones receptores singénicos de progenitores hematopoyéticos transducidos con un vector retroviral portador del oncogén *BCR/ABL*, genera un síndrome mieloproliferativo similar a la leucemia mieloide crónica. La infusión adicional de médula ósea alogénica origina un cuadro de evolución más lenta, similar a una recaída post-trasplante.
- 7- La co-infusión de linfocitos T haploidénticos en receptores con LMC genera un efecto injerto contra leucemia que impide el desarrollo de la enfermedad.

8- La infusión de mMSC-Ad presenta una eficacia reducida para prevenir la enfermedad Injerto contra Huésped (EICH) en el contexto de una recaída de LMC en un modelo de ratón. Sin embargo, la infusión de mMSC-Ad en receptores sin leucemia previene el desarrollo de EICH.

9- La respuesta de los linfocitos T a las células leucémicas que contienen el oncogén *BCR/ABL* -detectada *in vitro*-, sumada al ambiente inflamatorio del TPH alogénico podría explicar la reducida eficacia de las MSC para controlar el EICH en un contexto leucémico.

X

- I. ÍNDICE
- II. ABREVIATURAS
- III. RESUMEN
- IV. INTRODUCCIÓN
- V. OBJETIVOS
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSIÓN
- IX. CONCLUSIONES
- X. BIBLIOGRAFÍA**
- XI. ANEXOS

1. Friedenstein AJ, Latzinik NW, Grosheva AG, Gorskaya UF. Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. *Exp Hematol*. 1982;10:217-227.
2. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-147.
3. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*. 1999;181:67-73.
4. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*. 2003;10:228-241.
5. Simmons PJ, Masinovsky B, Longenecker BM, Berenson R, Torok-Storb B, Gallatin WM. Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1992;80:388-395.
6. Silva WA, Jr., Covas DT, Panepucci RA, et al. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2003;21:661-669.
7. Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor KC. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells*;28:788-798.
8. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res*. 1998;16:406-413.
9. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998;279:1528-1530.
10. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000;61:364-370.
11. Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EK. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg*. 2003;75:775-779.
12. Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, et al. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;330:1153-1161.
13. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol*. 1999;107:275-281.
14. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7:211-228.
15. Miao Z, Jin J, Chen L, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*. 2006;30:681-687.
16. in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica*. 2003;88:845-852.
17. Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J, Colmenero I, Ramirez M, Bueren JA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells*. 2006;24:2582-2591.

18. Puissant B, Barreau C, Bourin P, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol.* 2005;129:118-129.
19. Stewart K, Monk P, Walsh S, Jefferiss CM, Letchford J, Beresford JN. STRO-1, HOP-26 (CD63), CD49a and SB-10 (CD166) as markers of primitive human marrow stromal cells and their more differentiated progeny: a comparative investigation in vitro. *Cell Tissue Res.* 2003;313:281-290.
20. Nakagami H, Morishita R, Maeda K, Kikuchi Y, Ogihara T, Kaneda Y. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler Thromb.* 2006;13:77-81.
21. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol.* 2001;189:54-63.
22. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7:393-395.
23. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8:315-317.
24. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation.* 2003;75:389-397.
25. Potian JA, Aviv H, Ponzio NM, Harrison JS, Rameshwar P. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *J Immunol.* 2003;171:3426-3434.
26. Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation.* 2003;76:1208-1213.
27. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy.* 2003;5:485-489.
28. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol.* 2003;57:11-20.
29. Krampera M, Glennie S, Dyson J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood.* 2003;101:3722-3729.
30. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002;99:3838-3843.
31. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood.* 2005;106:1755-1761.
32. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005;105:1815-1822.
33. Maccario R, Podesta M, Moretta A, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica.* 2005;90:516-525.

34. Selmani Z, Naji A, Zidi I, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells*. 2008;26:212-222.
35. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005;105:4120-4126.
36. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34⁺-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2006;177:2080-2087.
37. Li H, Guo Z, Jiang X, Zhu H, Li X, Mao N. Mesenchymal stem cells alter migratory property of T and dendritic cells to delay the development of murine lethal acute graft-versus-host disease. *Stem Cells*. 2008;26:2531-2541.
38. Zhang W, Ge W, Li C, et al. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev*. 2004;13:263-271.
39. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation*. 2007;83:71-76.
40. Augello A, Tasso R, Negrini SM, et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*. 2005;35:1482-1490.
41. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107:367-372.
42. Traggiai E, Volpi S, Schena F, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. *Stem Cells*. 2008;26:562-569.
43. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*. 1989;47:187-376.
44. Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:197-223.
45. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*. 2006;107:1484-1490.
46. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. 2008;111:1327-1333.
47. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. 2006;24:74-85.
48. Poggi A, Prevosto C, Massaro AM, et al. Interaction between human NK cells and bone marrow stromal cells induces NK cell triggering: role of NKp30 and NKG2D receptors. *J Immunol*. 2005;175:6352-6360.
49. Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunol Today*. 1999;20:469-473.

50. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med*. 1999;189:1363-1372.
51. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004;103:4619-4621.
52. Harizi H, Juzan M, Pitard V, Moreau JF, Gualde N. Cyclooxygenase-2-issued prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *J Immunol*. 2002;168:2255-2263.
53. Choudhry MA, Hockberger PE, Sayeed MM. PGE2 suppresses mitogen-induced Ca²⁺ mobilization in T cells. *Am J Physiol*. 1999;277:R1741-1748.
54. Choudhry MA, Ahmed Z, Sayeed MM. PGE(2)-mediated inhibition of T cell p59(fyn) is independent of cAMP. *Am J Physiol*. 1999;277:C302-309.
55. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol*. 2002;23:144-150.
56. Morandi F, Raffaghello L, Bianchi G, et al. Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class I-restricted T-cell responses against viral or tumor-associated antigens. *Stem Cells*. 2008;26:1275-1287.
57. Deeg HJ. How I treat refractory acute GVHD. *Blood*. 2007;109:4119-4126.
58. Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, et al. Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2003;102:756-762.
59. Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 1991;324:667-674.
60. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004;363:1439-1441.
61. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;371:1579-1586.
62. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2006;81:1390-1397.
63. Fang B, Song Y, Zhao RC, Han Q, Lin Q. Using human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as salvage therapy for hepatic graft-versus-host disease resembling acute hepatitis. *Transplant Proc*. 2007;39:1710-1713.
64. Fang B, Song YP, Liao LM, Han Q, Zhao RC. Treatment of severe therapy-resistant acute graft-versus-host disease with human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant*. 2006;38:389-390.
65. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11:389-398.
66. Sudres M, Norol F, Trenado A, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J Immunol*. 2006;176:7761-7767.
67. Kolb HJ, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood*. 2004;103:767-776.
68. Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*. 2008;112:4371-4383.

69. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood*. 1995;86:2041-2050.
70. Collins RH, Jr., Shpilberg O, Drobyski WR, et al. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*. 1997;15:433-444.
71. Djouad F, Plence P, Bony C, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*. 2003;102:3837-3844.
72. Djouad F, Bony C, Apparailly F, Louis-Plence P, Jorgensen C, Noel D. Earlier onset of syngeneic tumors in the presence of mesenchymal stem cells. *Transplantation*. 2006;82:1060-1066.
73. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. 1990;247:824-830.
74. de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, et al. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1982;300:765-767.
75. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst*. 1960;25:85-109.
76. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*. 1990;247:1079-1082.
77. Puil L, Liu J, Gish G, et al. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *Embo J*. 1994;13:764-773.
78. Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM, Greaves MF. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*. 1987;328:342-344.
79. Cortez D, Kadlec L, Pendergast AM. Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol Cell Biol*. 1995;15:5531-5541.
80. Sanchez-Garcia I, Grutz G. Tumorigenic activity of the BCR-ABL oncogenes is mediated by BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:5287-5291.
81. Cobaleda C, Gutierrez-Cianca N, Perez-Losada J, et al. A primitive hematopoietic cell is the target for the leukemic transformation in human philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;95:1007-1013.
82. Calabretta B, Perrotti D. The biology of CML blast crisis. *Blood*. 2004;103:4010-4022.
83. Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood*. 2008;112:4808-4817.
84. Savage DG, Goldman JM. Allografting for chronic myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol*. 1997;4:369-376.
85. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402-408.
86. Bogunovic M, Ginhoux F, Wagers A, et al. Identification of a radio-resistant and cycling dermal dendritic cell population in mice and men. *J Exp Med*. 2006;203:2627-2638.
87. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24:386-398.

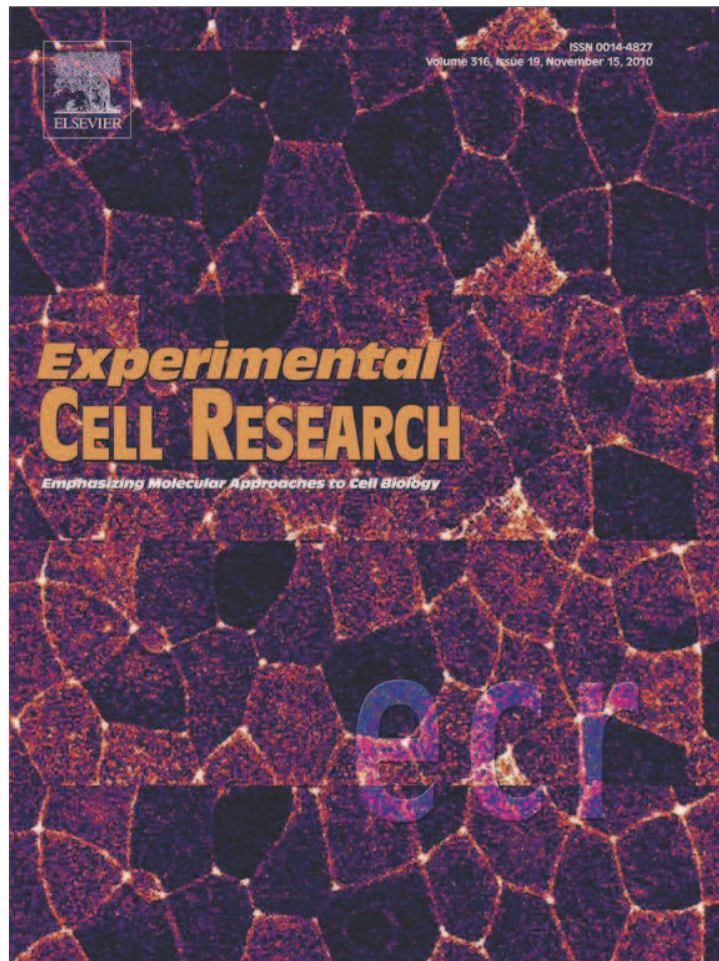
88. Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res.* 2005;305:33-41.
89. Larghero J, Vija L, Lecourt S, Michel L, Verrecchia F, Farge D. [Mesenchymal stem cells and immunomodulation: toward new immunosuppressive strategies for the treatment of autoimmune diseases?]. *Rev Med Interne.* 2009;30:287-299.
90. Rasmusson I, Le Blanc K, Sundberg B, Ringden O. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol.* 2007;65:336-343.
91. Lee RH, Kim B, Choi I, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem.* 2004;14:311-324.
92. Xu G, Zhang L, Ren G, et al. Immunosuppressive properties of cloned bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Res.* 2007;17:240-248.
93. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. Mesenchymal stem cells (MSC) inhibit monocyte-derived dendritic cell (DC) maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood.* 2009.
94. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 2007;110:3499-3506.
95. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:726-736.
96. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med.* 2009;15:42-49.
97. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood.* 2005;105:2821-2827.
98. Wagner W, Wein F, Seckinger A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005;33:1402-1416.
99. Koch CA, Geraldles P, Platt JL. Immunosuppression by embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2008;26:89-98.
100. Smit WM, Rijnbeek M, van Bergen CA, Fibbe WE, Willemze R, Falkenburg JH. T cells recognizing leukemic CD34(+) progenitor cells mediate the antileukemic effect of donor lymphocyte infusions for relapsed chronic myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:10152-10157.
101. Van Etten RA. Retroviral transduction models of Ph⁺ leukemia: advantages and limitations for modeling human hematological malignancies in mice. *Blood Cells Mol Dis.* 2001;27:201-205.
102. Le Blanc K, Ringden O. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2006;18:586-591.
103. Durakovic N, Bezak KB, Skarica M, et al. Host-derived Langerhans cells persist after MHC-matched allografting independent of donor T cells and critically influence the alloresponses mediated by donor lymphocyte infusions. *J Immunol.* 2006;177:4414-4425.
104. Terme M, Borg C, Guilhot F, et al. BCR/ABL promotes dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *Cancer Res.* 2005;65:6409-6417.
105. Choudhury A, Gajewski JL, Liang JC, et al. Use of leukemic dendritic cells for the generation of antileukemic cellular cytotoxicity against Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 1997;89:1133-1142.

106. Bocchia M, Korontsvit T, Xu Q, et al. Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides. *Blood*. 1996;87:3587-3592.
107. Chakraverty R, Sykes M. The role of antigen-presenting cells in triggering graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia. *Blood*. 2007;110:9-17.
108. Falkenburg JH, Smit WM, Willemze R. Cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses against acute or chronic myeloid leukemia. *Immunol Rev*. 1997;157:223-230.
109. Falkenburg JH, Wafelman AR, Joosten P, et al. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood*. 1999;94:1201-1208.

XI

- I. ÍNDICE
- II. ABREVIATURAS
- III. RESUMEN
- IV. INTRODUCCIÓN
- V. OBJETIVOS
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSIÓN
- IX. CONCLUSIONES
- X. BIBLIOGRAFÍA

XI. ANEXOS

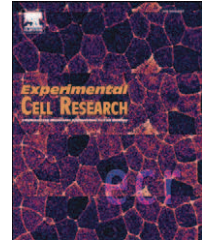


This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/yexcr

Research Article

Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells

Rosa Yañez, Alberto Oviedo, Montserrat Aldea, Juan A. Bueren, María L. Lamana*

Hematopoiesis and Gene Therapy Division, Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBER-ER), Madrid, Spain

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:

Received 3 December 2009

Revised version received 10 May 2010

Accepted 16 August 2010

Available online 8 September 2010

Keywords:

Mesenchymal stromal cells
Immunosuppressive properties
Prostaglandin E2
Dendritic cells
T lymphocytes

ABSTRACT

Mesenchymal stromal cells (MSCs) have important immunosuppressive properties, but the mechanisms and soluble factors involved in these effects remain unclear. We have studied prostaglandin-E2 (PGE2) as a possible candidate implied in adipose tissue-derived MSCs (Ad-MSCs) immunosuppressive properties over dendritic cells and T lymphocytes, compared to bone marrow derived MSCs (BM-MSCs). We found that both MSCs inhibited the maturation of myeloid-DCs and plasmacytoid-DCs. High levels of PGE2 were detected in DCs/MSCs co-cultures. Its blockade with indomethacin (IDM) allowed plasmacytoid-DCs but not myeloid-DCs maturation. Additionally, high levels of PGE2 were found in co-cultures in which Ad-MSCs or BM-MSCs inhibited activated T cells proliferation and pro-inflammatory cytokines production. PGE2 blockade by IDM preserved T lymphocytes proliferation but did not restore the pro-inflammatory cytokines secretion. However, an increased expression of transcription factors and cytokines genes involved in the Th1/Th2 differentiation pathway was detected in the T cells co-cultured with Ad-MSCs, but not with BM-MSCs. In conclusion, we propose that PGE2 is a soluble factor mediating most of the immunosuppressive effects of Ad-MSCs and BM-MSCs over p-DCs maturation and activated T lymphocytes proliferation and cytokine secretion.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Mesenchymal stromal cells (MSCs) are multipotential non-hematopoietic progenitor cells that can be obtained from several tissues, including the bone marrow (BM-MSCs) [1] and the adipose tissue (Ad-MSCs) [2,3]. MSCs do not have a specific

immunophenotype, do not express the hematopoietic markers CD34, CD45 and CD31 while they express CD29, CD73 and CD90 [4]. MSCs secrete a large variety of growth factors and cytokines [5] and can differentiate to several lineages [1], including adipose, osteogenic and chondrogenic tissues. MSCs have important immunosuppressive properties over most cellular populations of

* Corresponding author. Hematopoiesis and Gene Therapy Division, CIEMAT/CIBER-ER Avenida Complutense 22, 28040 Madrid, Spain. Fax: +34 913466484.

E-mail addresses: rosamaria.yanez@ciemat.es (R. Yañez), alberto.oviedo@ciemat.es (A. Oviedo), montserrat.aldea@ciemat.es (M. Aldea), juan.bueren@ciemat.es (J.A. Bueren), maruja.lamana@ciemat.es (M.L. Lamana).

URL: <http://www.ciemat.es> (M.L. Lamana).

Abbreviations: Ad-MSCs, adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells; BM-MSCs, bone marrow-derived mesenchymal stromal cells; IDM, indomethacin; PGE2, Prostaglandin-E2; m-DC, myeloid DC; p-DC, plasmacytoid DC.

RUNNING HEAD OF THE TITLE: MSCs effect on GVL in a CML mouse model

**TITLE: EFFECT OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS ON THE GRAFT-
VS-CHRONIC MYELOID LEUKEMIA EFFECT IN A MOUSE MODEL OF
HAPLOIDENTICAL BONE MARROW TRANSPLANT**

AUTHORS: Alberto Oviedo¹, Rosa Yañez¹, Isabel Colmenero², Montserrat Aldea¹, Antonio Rubio¹, Juan Antonio Bueren¹ and María Luisa Lamana¹

INSTITUTIONS: ¹Hematopoiesis and Gene Therapy Division. Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBER-ER). Madrid. Spain. ²Department of Pathology, Hospital Niño Jesús. Madrid, Spain.

CORRESPONDING AUTHOR: M. L. Lamana. Hematopoiesis and Gene Therapy Division. CIEMAT/CIBER-ER Avenida Complutense, nº 22. 28040 Madrid. Spain. E-mail: maruja.lamana@ciemat.es. Phone: 34-913460890. Fax: 34-913466484.

ABSTRACT

Background: Mesenchymal stromal cells (MSCs) immunosuppressive properties have been applied to treat Graft-vs.-Host Disease (GVHD) in allogeneic hematopoietic stem cell transplants (HSCT). We have previously demonstrated in a mouse model that MSCs infusion early after haplo-HSCT prevents GVHD. Now, we investigated the impact that MSCs have on GVL effect in a leukemic mouse model of haploidentical HSCT. **Design and Methods/Results:** First, to mimic relapses in Chronic Myeloid